Aus dem Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Hämatologische Abteilung
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. H. Rühl

In vitro Untersuchungen zur Störung der B-Zellaktivierung bei Patienten mit aktivem M. Hodgkin

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
REIM, JOHANNES
aus KEMPTEN/Allgäu

1985

Aus dem Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin, Hämatologische Abteilung

Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. H. Rühl

In vitro Untersuchungen zur Störung der B-Zellaktivierung bei Patienten mit aktivem M. Hodgkin

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
REIM, JOHANNES
aus KEMPTEN/Allgäu

Referent: Prof. Dr. med. H. Rühl

Korreferent: Prof. Dr. med. D. Huhn

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 9. Juli 1985

Meinen Eltern
in Dankbarkeit

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547201_0071

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	6
2. Material und Methoden	9
2.1. Normalkollektiv	9
2.2. Patientenkollektiv	9
2.3. Zellpräparation	10
2.4. Kulturbedingungen	11
2.5. Generation von Modulator-Zellen	12
2.6. Stimulation der Immunglobulinsynthese u. -sekretion	12
2.7. Plaque Assay (RHPA)	13
2.7.1. Kopplung der Schaferythrozyten mit Protein A	13
2.7.2. Spontanplaques	14
2.8. Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen mit Immunmarkern	14
2.8.1. Zellpräparation	15
2.8.2. Indirekter Fluoreszenztest	15
2.8.3. Rosettentest	15
2.9. Monozytenanreicherung	16
2.10. E-Rosetten-Trennung	16
3. Ergebnisse	18
3.1. Dosiswirkungsbeziehung der durch verschiedene PWM-Konzentrationen induzierten B-Lymphozytendifferenzierung	18
3.2. Inkubationszeit	18
3.3. ISC bei Normalpersonen und Patienten mit HD nach Kultur	22
3.3.1. Spontanplaques	22
3.4. Bestimmung von PBL-Subpopulationen mit monoklonalen Antikörpern	23
3.5. Kokulturen	27
3.5.1. Kokulturen mit ConA-präinkubierten Modulatorzellen	29

3.5.1.1. Vorversuche 29
3.5.1.2. Effekt von mit und ohne ConA präinkubierten Modulatorzellen von NP und Patienten mit HD auf normale Effektorzellen 31
3.5.2. Kokulturen mit Monozyten 35
3.5.3. Kokulturen mit E-Rosetten-getrennten peripheren B- und T-Lymphozyten 42

4. Diskussion 45
4.1. PBL-Subpopulationen bei Patienten mit HD 48
4.2. ConA induzierte Suppression bei HD-Patienten und Normalpersonen 50
4.3. Monozyten induzierte Suppression bei HD-Patienten und Normalpersonen 53
4.4. Suppression in Kokulturen mit peripheren Blutlymphozyten und Lymphozytensubpopulationen von HD-Patienten und Normalpersonen 57

5. Zusammenfassung 60

6. Literaturverzeichnis 62

Abkürzungsverzeichnis

α-MDM	α-methyl-D-Mannoside
HBSS	Hankslösung (Hank's balanced salt solution)
ConA	Concanavalin A
E	Effektorlymphozyten (= frisch isolierte Lymphozyten)
HD	M. Hodgkin (Hodgkin disease)
HLA	Haupthistokompatibilitätssystem des Menschen (abgeleitet von human lymphocyte system A)
IG	Immunglobuline
ISC	Immunglobulin sezernierende Zellen
K-Zellen	Killerzellen
M	Modulatorlymphozyten (= präinkubierte Lymphozyten)
mABS	monoklonale Antikörper
MLC	Mixed Lymphocyte Culture
MNC	Mononukleäre Zellen (mononuclear cells)
NK-Zellen	Natural Killerzellen
NP	Normalperson
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat gepufferte Lösung
PFC	Plaque formende Zellen
PWM	Pokeweed Mitogen
RHPA	Plaque Assay (reverse hemolytic plaque assay)
SRBC	Schaferythrozyten (sheep red blood cells)

1. Einleitung

Ätiologie und Pathogenese des Morbus Hodgkin sind immer noch unbekannt. Herkunft und Natur der bei M. Hodgkin typischen Zellen, der Hodgkin Zellen und der Reed-Sternbergschen Riesenzellen sind kontrovers (39, 40, 81). Ausdruck des mit dem M. Hodgkin assoziierten Immundefekts in vivo ist u.a. eine herabgesetzte Fähigkeit, fremde Hauttransplantate abzustoßen (44), weiter eine Beeinträchtigung der Hautreaktionen vom verzögerten Typ (7, 13) sowie eine erhöhte Infektionsanfälligkeit (6). Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß vor allem die zellvermittelte Immunantwort bei Patienten mit M. Hodgkin eingeschränkt ist, während die humorale Immunantwort bei diesen Patienten, zumindest in frühen Stadien, wenig beeinträchtigt zu sein scheint. Vor allem die Prädominanz von T-Zellen in den befallenen Organen von Patienten mit M. Hodgkin führte zur Annahme, daß es sich beim M. Hodgkin um die Manifestation einer zellulären Immunreaktion gegen abnormale Zellen handelt (95). Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern konnten diese als kleine Zellpopulation klassifiziert, jedoch bisher nicht definiert werden (81).
Funktionelle, in vitro Versuche zeigten eine Minderstimulierbarkeit der Lymphozyten von Patienten mit M. Hodgkin durch Mitogene (z.B. durch Phytohemagglutinin, 8, 32), durch Antigene (20, 27), weiter die Unfähigkeit der Patienten-Lymphozyten zu einer normalen Immunantwort in der "mixed lymphocyte culture reaction" (MLR) (2).
Die Mechanismen, die der beeinträchtigten Immunfunktion bei M. Hodgkin zugrunde liegen, scheinen komplex zu sein. Sowohl eine absolute Erniedrigung der T-Lymphozyten, ein Defekt der T- und B-Zellen selbst, von den Lymphozyten sezernierte Faktoren, T-Zellen mit gesteigerter suppressiver Aktivität, als auch "Suppressor"-Monozyten wurden als ursächlich angenommen.
Bei in vitro Studien haben sich Mitogene bei funktionellen Untersuchungen der Immunantwort als sehr hilfreich erwiesen. Ohne vorausgehende Sensibilisierung ist es möglich, periphere Blutlymphozyten durch Mitogene in teilungsfähige Zellen zu transformieren (9, 61, 79). Während PHA und ConA vor allem die T-Lympho-

zyten stimulieren (wobei ConA-Stimulation vor allem zu einer T-Suppressorzellaktivierung führt (30, 75, 86)), weiß man von PWM, daß es nicht nur die Proliferation von T-Zellen induziert, sondern auch die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten zu aktiv Ig sezernierenden Zellen (92, 93). PWM eignet sich damit gut zur in vitro Untersuchung der B-Zelldifferenzierung; die PWM-induzierte B-Zelldifferenzierung wird allerdings von T-Zellen und anderen mononukleären Zellen, die in der Kultur sind, kontrolliert (23, 43, 73). Das heißt, einer gestörten B-Zelldifferenzierung muß nicht notwendigerweise ein B-Zelldefekt zugrunde liegen, sie kann genausogut Ausdruck einer Helferzell-Suppressorzellimbalance sein (73). Neben den Monozyten, welche die PWM-induzierte B-Zelldifferenzierung supprimieren (45) oder stimulieren können (17, 63, 67), ist sowohl die T-Lymphozytenhilfe (23, 58, 85) bei der PWM induzierten B-Zelldifferenzierung wie die T-Zell-vermittelte Suppression (53, 84) in der Literatur gut dokumentiert. Das heißt, ein Testsystem, welches Einsicht in die B-Zelldifferenzierung vermittelt, eigent sich darüber hinaus zur funktionellen Untersuchung der Helfer-Suppressor-Balance.
Neben der Konzentrationsbestimmung von Immunglobulin-Überständen von Lymphozytenkulturen und Testsystemen, die den Einbau radioaktiv markierter DNA-Bausteine messen, eignet sich der 1963 von Jerne und Nordin (37) eingeführte Plaqueassay zu funktionellen Untersuchungen der B-Lymphozytenaktivierung. Jedoch nur mit dem Plaqueassay läßt sich die Antikörperproduktion einzelner Zellen messen.

Mit der weiterentwickelten Form - dem Reverse Hemolytic Plaque Assay (RHPA) (22, 29, 77) - des Plaqueassays ist die Möglichkeit gegeben den Anteil der Immunglobulin sezernierende Zellen an der B-Lymphozyten-Gesamtpopulation zu bestimmen. Im RHPA werden als Zielzellen Schaferythrozyten benützt, an die Protein A (von Staphylococcus aureus) gekoppelt ist. Protein A bindet das Fc-Fragment von Antikörpern. Mit Protein A gekoppelte Schaferythrozyten (SRBC) werden zusammen mit aktivierten Lymphozyten

inkubiert und binden die von den Lymphozyten sezernierten Immunglobuline. Hinzufügen von gereinigten Anti-Human-Serum und Complement führt zur Hämolyse der SRBC und erlaubt damit die Auszählung der einzelnen ISC.
Die Transformierung von B-Lymphozyten in ISC durch Stimulation mit PWM und die quantitative Bestimmung der ISC mit dem RHPA eignet sich damit gut als funktionelles Testsystem, nicht nur zur Erfassung der B-Zellfunktion (und damit der Interaktion von B-Zellen, T-Zellen und Monozyten) bei der normalen Immunantwort, sondern insbesondere auch zur Erfassung immunpathogenetischer Zusammenhänge bei Erkrankungen, die primär oder sekundär mit einer Immundefizienz einhergehen.
Wir haben in der vorliegenden Arbeit im RHPA die PBL von Patienten mit M. Hodgkin und Normalpersonen untersucht. Dabei haben wir die genannten Möglichkeiten, wie sie in der Literatur als ursächlich für die bei HD bekannte Immundefizienz angenommen werden (s.o.), soweit das mit dem RHPA als Testsystem möglich ist, untersucht. Um die Interpretation der Ergebnisse zu erleichtern, haben wir weiter mit Hilfe von Immunmarkern die Lymphozytensubpopulationen bei einer Reihe der von uns untersuchten Patienten bestimmt.

2. Material und Methoden

Untersucht wurden Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Normalpersonen und unbehandelten Morbus-Hodgkin-Patienten. In einem Fall konnten die Milzlymphozyten eines unbehandelten HD-Patienten untersucht werden.

2.1. Normalkollektiv

In jedem Versuch mit peripheren Blutlymphozyten (PBL) von HD-Patienten wurden jeweils die PBL von 2 Kontrollpersonen mituntersucht. Modifizierte Testbedingungen wurden mit den Lymphozyten von gesunden Spendern erprobt.
Insgesamt wurden 43 Normalpersonen untersucht, davon waren 17 männlichen und 26 weiblichen Geschlechts, das Alter reichte von 17 bis 58, das Durchschnittsalter betrug 26 Jahre.

2.2. Patientenkollektiv

Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten waren alle an Morbus-Hodgkin erkrankt und befanden sich im Rahmen der Stadienteilung (staging) in der Zeit von Dezember 1981 bis März 1984 in der stationären Behandlung der Abteilung Hämatologie/Onkologie des Klinikums Steglitz der Freien Universität Berlin. Bis auf einen Patienten mit einem Rezidiv (die Behandlung lag bei Untersuchung allerdings schon mehr als 2 Jahre zurück), waren alle Patienten unbehandelt.
Untersucht wurden insgesamt 16 Patienten, davon waren 7 weiblichen und 9 männlichen Geschlechts, das Alter reichte von 17 bis 78 Jahren, das Durchschnittsalter betrug 44 Jahre.
Das klinische Stadium mit dem symptomatischen Status, die histologische Diagnose, sowie Alter und Geschlecht der Patienten zeigt Tab. 1.
Das Stadium wie der symptomatische Status wurden entsprechend der Ann Arbor Klassifikation (5) bestimmt. Die histologische Klassifizierung erfolgte nach der auf Lukes und Butler zurückgehenden Klassifikation (51).

Tab. 1: Zusammenfassung der klinischen und histologischen Daten der untersuchten HD-Patienten

Name	Geschlecht	Alter	Stadium	Histologischer Typ
P.G.	w	48	II, A	nodulär sklerosierend
R.D.	m	19	III, B	lymphozytenreich
B.A.	w	66	II, B	keine histologische Zuordnung, Diagnose wurde zytol. gesichert
H.P.	m	42	III, A	Mischtyp
St.H.	m	39	II, B	nodulär sklerosierend
St.E.	m	66	II, A	Mischtyp
W.W.	m	21	III, A	nodulär, ohne Sklerose
F.F.	m	22	IV, A	nodulär sklerosierend
T.H.	m	57	II, A	Mischtyp mit Übergang an die lymphozytenarme Form
D.Ch.	w	78	II, B	Mischtyp
B.M.	m	28	I, A	Mischtyp
W.A.	w	17	III, B	nodulär sklerosierend
H.F.	w	71	III, A	nodulär sklerosierend
R.S.	w	20	II, B	nodulär sklerosierend
N.H.	m	72	IV, B	nodulär sklerosierend

A = Fehlen von Allgemeinsymptomen

B = Vorhandensein von Allgemeinsymptomen

Die histologischen Untersuchungen wurden alle vom pathologischen Institut der Universität Kiel (Professor Lennert) durchgeführt. Die peripheren Blutlymphozyten wurden bei allen Patienten untersucht, Milzlymphozyten bei einem Patienten.

2.3. Zellpräparation

Von Patienten wie von Normalpersonen wurden 30-120 ml Blut aus einer Armvene entnommen. In die verwendeten Einmalspritzen wurde vorher 3 ml Heparinlösung (10 IE/ml) aufgezogen. Unter

sterilen Kautelen wurde das Blut im Verhältnis 1:1 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und nach Überschichtung auf 15 ml Ficoll-Hypaque 40 min. bei 400 x g zentrifugiert. Der im Überstand sichtbare Ring mit mononukleären Zellen (80% Lymphozyten, 20% Monozyten) wurde abpipettiert und viermal mit RPMI 1640 medium (Seromed) bei 400 x g für 10 Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte die Suspension des Zellsediments in 5 ml RPMI 1640 medium und die Zählung der mononukleären Zellen (MNC) im Coulter Counter.
Milzlymphozyten haben wir aus zerkleinerten Milzfragmenten erhalten, indem wir diese unter stetem Spülen mit Medium durch ein Sieb gepreßt haben. die so erhaltene, zellreiche Suspension wurde dreimal mit Medium gewaschen, schließlich auf 15 ml Ficoll-Hypaque überschichtet und wie oben beschrieben für die Kulturen vorbereitet.

2.4. Kulturbedingungen

Die gewonnenen mononukleären Zellen (MNC) wurden in einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 medium eingebracht, das vorher mit 10% hitzeinaktivierten fetalem Kälberserum (FCS, Gibco Lab., England), 1% L-Glutamin, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin 100 µg/ml angereichert worden war.
Pro Kulturansatz wurden 3 ml Zellsuspension in 16 x 125 mm Falcon Plastikröhrchen pipettiert und anschließend im Brutschrank bei 37°C und unter Begasung mit Luft und 5% CO_2 für 3-8 Tage inkubiert.
In Kokulturen wurden 1,5 x 10^6 MNC von einem Individuum A mit einer gleichen Anzahl von Zellen eines Individuums B inkubiert.
Nach 6-7tägiger Inkubationszeit wurden die Zellen viermal mit Hank's balanced Salt Solution (HBSS) gewaschen und auf eine Konzentration von 1 x 10^5 Zellen pro ml eingestellt. Der Anteil der toten Zellen wurde mit einer Trypanblau-Färbung bestimmt und betrug zwischen 2 und 18%.

2.5. Generation von Modulator-Zellen

Um Modulator-Zellen zu generieren, wurden Lymphozyten entweder unter den oben genannten Kulturbedingungen für 48 Stunden ohne Mitogen inkubiert oder unter den gleichen Bedingungen, aber in Gegenwart von 10 µg/ml Concanavalin A (Calbiochem., USA). Nach 48 Stunden wurden die Zellen viermal mit RPMI 1640 medium gewaschen. Anschließend wurden sie mit frisch isolierten Effektor-Zellen, wie oben beschrieben, kokultiviert.
In Vorversuchen wurden die Modulator-Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit und ohne ConA und einmaligem Waschen mit RPMI 1640 unterschiedlich behandelt:
a) Inkubation für 45 Minuten bei 37°C mit und ohne Mitomycin (50 µg/ml) (Serva, Deutschland). Mit Mitomycin C wurde inkubiert, um die DNA-Synthese der Modulatorzellen zu hemmen. Anschließend dreimaliges Waschen mit 30 mMα-Methyl-D-Mannoside (Sigma, USA), das die zelluläre Bindung von ConA kompetitiv hemmt (vgl. 57).
Die präinkubierten MNC wurden mit α-MDM gewaschen, um Zelloberflächengebundenes ConA zu verdrängen und so den ConA-Einfluß auf die Modulatorenlymphozyten zu beschränken.
b) Inkubation für 45 Minuten bei 37°C mit und ohne Mitomycin C. Das nachfolgende Waschen der MNC erfolgte dreimal mit RPMI 1640 medium.

2.6. Stimulation der Immunglobulinsynthese und -sekretion

Nach Vorversuchen mit unterschiedlichen Pokeweed Mitogen (PWM) Konzentrationen (1,5, 5,0 und 15,0 µm/ml) wurde die optimale Konzentration von 5,0 µl/ml zur Stimulation benutzt.

2.7. Plaque Assay (RHPA)

Das Prinzip sowie technische Verbesserungen des RHPA sind von verschiedenen Autoren beschrieben worden (11, 14, 15, 22, 29). 100 µl einer auf 1 x 10^5 Zellen pro ml eingestellten Lymphozytensuspension und 25 µl einer 30%igen Suspension von Schaferythrozyten, an die Protein A von Staphylococcus aureus gekoppelt war, wurden in 10 x 75 mm Glasröhrchen mit 250 µl 0,8% Agarose (Indubiose A 37, L'Industrie Biologique Francaise, France) pipettiert. Die Glasröhrchen wurden in einem Wasserbad mit 41°C vorgewärmt.
Der gesamte Inhalt des Röhrchens wurde mit Hilfe eines elektrischen Mixers kräftig durchmischt und anschließend auf 60 x 15 mm große Plastikpetrischalen pipettiert. Die Petrischalen waren vorher mit 4 ml 2,5% Agarose beschichtet worden. Nach 10 Minuten wurden auf jede Petrischale 1 ml einer 1:100 verdünnten Lösung Anti-Human-Immunglobulin (spezifisch gegen IgG, IgA und IgM (Medac FRG)) vom Kaninchen dazugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde 1:8 verdünntes Meerschweinchen Complement (Behring) dazu pipettiert und die Petrischalen für weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgekippt und die Plaque bildenden Zellen gezählt.

Bei allen Versuchen wurden zur Kontrolle Petrischalen mitgeführt, die entweder kein Antiserum, kein Complement oder anstatt 100 µl Lymphozytensuspension 100 µl Hank's balanced salt solution enthielten. In den Kontrollen durften keine oder höchstens 1 bis 2 Plaques zu finden sein.
Die Gesamtzahl der Plaques wird jeweils bezogen auf 10^6 Lymphozyten ausgedrückt. Bei der Ermittlung der Gesamtzahl wurde aus jeweils zwei Zählungen ein Mittelwert gebildet.

2.7.1. Kopplung der Schaferythrozyten mit Protein A

10-15 ml frische Schaferythrozyten wurden viermal mit steriler physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Dann wurden 1 ml der gewaschenen Schaferythrozyten zusammen mit 1 ml einer Protein A (von Staphylococcus

aureus) Lösung vorsichtig mit einer $CrCl_3$-Lösung (1:100 Verdünnung einer 0,65%igen Stammlösung) vermischt und eine Stunde im Wasserbad bei 30°C inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit eisgekühlter physiologischer NaCl-Lösung und 10minütiger Zentrifugation bei 300 x g in der auf 0°C gekühlten Zentrifuge, wurden die Erythrozyten noch einmal mit Hank's BSS gewaschen und auf einen Hämatokrit von ca. 30% gebracht.

2.7.2. Spontanplaques

Der Plaque Assay wird, wie oben beschrieben, mit frisch gewonnenen Lymphozyten durchgeführt. Neben der Inkubation mit 1 ml Anti-Human-Immunglobulin (spezifisch gegen IgA, IgG und IgM) haben wir in drei zusätzlichen Ansätzen die gleichen PBL mit jeweils 1 ml Anti-Human-IgA, Anti-Human-IgG und Anti-Human-IgM inkubiert.

2.8. Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen mit Immunmarkern

Bei 6 Patienten wurden mit Hilfe von Zellmarkern der Anteil der B-Lymphozyten, der T-Lymphozyten sowie T-Lymphozyten-Subpopulationen bestimmt.
T-Lymphozyten wurden aufgrund ihrer Eigenschaft, mit Neuraminidase vorbehandelten Schaferythrozyten Rosetten (E_N-R) zu bilden, bestimmt. B-Lymphozyten, T-Helfer-, T-Suppressorzellen und Natural Killer/Killerzellen (NK/K) wurden mit monoklonalen Antikörpern (mAbs) nachgewiesen. Folgende monoklonale Antikörper (mAbs) wurden verwandt: OKT 4, OKT 8, B 1, Leu 7.
OKT 4 markiert die T-Helfer/Inducer Subpopulation (46); OKT 8 die T-Suppressor Subpopulation (59). Leu 7 identifiziert ein Antigen, das fast alle NK/K-Zellen tragen (1).

2.8.1. Zellpräparation

Aus einer Armvene entnommenes, heparinisiertes Blut (30 ml) wurde nach 1:2 Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung vorsichtig über einen Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten pipettiert und 15 Minuten bei 700 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die abpippetierten Lymphozyten dreimal mit Phosphat gepufferter Lösung (PBS, Seromed) gewaschen und am Coulter Counter gezählt.

2.8.2. Indirekter Fluoreszenstest

800 µl Lymphozytensuspension in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Lymphozyten pro ml wurden mit 20 µl 1:500 verdünnter monoklonaler Antikörper auf Eis für 30 Minuten inkubiert und anschließend zweimal mit PBS, 0,02% bovinem Serum Albumin (BSA Behring) und 0,02% Natriumazid gewaschen und jeweils für 3 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurden 20 µl 1:25 verdünnter Fluoreszin-Antikörper GAM (Ziege gegen Maus) dazugegeben und erneut 30 Minuten im Eisbad inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde das Sediment mit 10 µl PBS aufgenommen, auf einen Objektträger gegeben und der Objektträger nach Hinzufügen von 5 µl PBS-Glyzerin mit einem Deckgläschen verschlossen. Die Auswertung erfolgte mit einem Zeiss UV Mikroskop mit einer Osram Hbd 200 Watt Birne, es wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt.

2.8.3. Rosettentest

Zur Bestimmung der T-Lymphozyten, die mit Schaferythrozyten Rosetten bilden, wurden Neuraminidase vorbehandelte Schaferythrozyten benutzt. Gleiche Teile von Lymphozytensuspension ($2,5 \times 10^6$ Lymphozyten pro ml) und 1% Neuraminidase vorbehandelter SRBC-Lösung wurden zusammen mit 20% hitzeinaktiviertem, fetalem Kälberserum (FCS) 12 Minuten inkubiert. Nach anschliessender Zentrifugation bei 150 x g für 10 Minuten wurden die Zellen erneut eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Auswertung er-

folgte wie beim indirekten Fluoreszenztest.

2.9. Monozytenanreicherung

Ausgenützt wurde die Fähigkeit von Monozyten, an der Oberfläche von Glas- und Plastik-Petrischalen zu haften. Jeweils 5 ml Lymphozytensuspension (2×10^6 Zellen/ml), (25% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum und 75% RPMI 1640 medium) wurden unter sterilen Kautelen in einer Plastikpetrischale (Durchmesser 10 cm) 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgekippt und aufbewahrt und drei- bis viermal mit RPMI medium nachgespült. Dann wurden die Monozyten mit einem Costar-Cell-Scraper (Tecnomara GmbH, Deutschland) vom Boden der Petrischale gelöst und mit einer Glaspipette gesammelt, anschließend dreimal gewaschen und im Coulter Counter gezählt.
Mit dieser Methode der Monozytenanreicherung lag der Anteil der Monozyten zwischen 75% und 90%. Diese Zahlen stammen nicht nur aus lichtmikroskopischen Untersuchungen, sondern ließen sich mit Marker-Untersuchungen (mit Leu M 3 als monozytenspezifischem mAbs) bestätigen.

2.10. E-Rosetten-Trennung

Menschliche T-Lymphozyten binden SRBC und bilden damit Rosetten (E-Rosetten). Die Rosettenbildung kann zur Identifizierung der T-Lymphozyten dienen, darüber hinaus auch zur Trennung von T- und B-Lymphozyten genutzt werden.
Zunächst wurden frische SRBC dreimal unter sterilen Kautelen mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und bei 400 x g jeweils 10 Minuten zentrifugiert. Dann wurden 2,5 ml SRBC-Sediment mit 47,5 ml RPMI 1640 medium verdünnt (5%ige SRBC-Suspension). Um eine stabile E-Rosettenbildung zu erhalten, wurden die SRBC 5%ige für 30 Minuten bei 37°C mit 400 µl Neuraminidase (Behringwerke, Deutschland) im Wasserbad inkubiert. Nach Abzentrifugieren und dreimaligem Waschen mit Medium wurde wieder eine 5%ige SRBC Suspension hergestellt.

Pro Rosettenansatz kamen zu 6 ml der 5%igen SRBC Suspension 3 ml FCS und 3 ml Lymphozytensuspension (vgl. Zellpräparation) in eine Konzentration von 1 x 10^7 Zellen/ml. Diese Mischung wurde 5 Minuten bei 700 UpM zentrifugiert, anschließend bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert. Nach Resuspendieren, erneuter Zentrifugation (5 Minuten bei 700 UpM) und Inkubation bei Raumtemperatur, diesmal über 40 Minuten, wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert, auf eine Ficoll-Hypaque Gradienten gebracht und 40 Minuten bei 400 x g zentrifugiert.
Der im Überstand sichtbare Ring mit nicht rosettenbildenden mononukleärer Zellen wurde abpipettiert und für Kokulturen vorbereitet (siehe 2.3.). Mit Hilfe von Immunmarkern konnte gezeigt werden, daß sich in dieser Fraktion zu 80-95% B-Lymphozyten befinden.
Nach Entfernung des ganzen Überstandes verblieben die E-Rosetten bildenden T-Lymphozyten. Um die SRBC zu lysieren, wurden diese Zellen 5 Minuten mit einem Ammonium-Chlorid-Puffer inkubiert, anschließend dreimal gewaschen und gezählt.

3. Ergebnisse

3.1. Dosiswirkungsbeziehung der durch verschiedene PWM-Konzentrationen induzierten B-Lymphozytendifferenzierung

In Vorversuchen wurden die für die Differenzierung von B-Lymphozyten in Immunglobulin sezernierende Zellen optimalen PWM-Konzentrationen ermittelt. Den Kulturen wurden PWM-Dosen von 0,5, 1,5, 5,0, 15,0 und 50 µl/ml zugesetzt. Kulturen ohne PWM liefen als Kontrolle parallel.
Eine optimale Stimulation fand sich wie Abb. 1 zeigt, bei den meisten Versuchen bei PWM-Konzentrationen von 1,5 und 5,0 µl pro ml. Eine einheitliche optimale Dosis konnte nicht ermittelt werden. Alle weiteren Experimente wurden, neben einer nicht stimulierten Kultur als Kontrolle, mit einer PWM-Konzentration von 5,0 µl/ml und, wenn genügend Zellen zu weiteren Ansätzen vorhanden waren, mit einer zusätzlichen Konzentration von 15 µl/ml durchgeführt.

3.2. Inkubationszeit

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit wurden ungetrennte PBL von gesunden Normalpersonen und von Morbus Hodgkin Patienten mit 1,5 µl/ml inkubiert und vom 3. bis zum 9. Tag nach Kulturbeginn in täglichem Abstand mit dem Plaque Assay auf die Anzahl der ISC untersucht.
Aus den Abb. 2a und b geht hervor, daß die höchsten Plaquezahlen nach Inkubationszeiten von 6 und 7 Tagen erzielt werden und zwar bei NP wie bei Patienten mit HD. Ebenfalls in beiden Gruppen kommt es zwischen dem 4. und 5. Tag zum steilsten Anstieg der ISC. War es nach 7 Tagen Inkubation zu keiner signifikanten Zunahme der ISC gekommen, führte auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 8, 9 oder 10 Tage nicht zu einem Anstieg der ISC. In allen weiteren Versuchen wurde demzufolge 7 Tage inkubiert, in einigen Fällen auch 6 Tage.

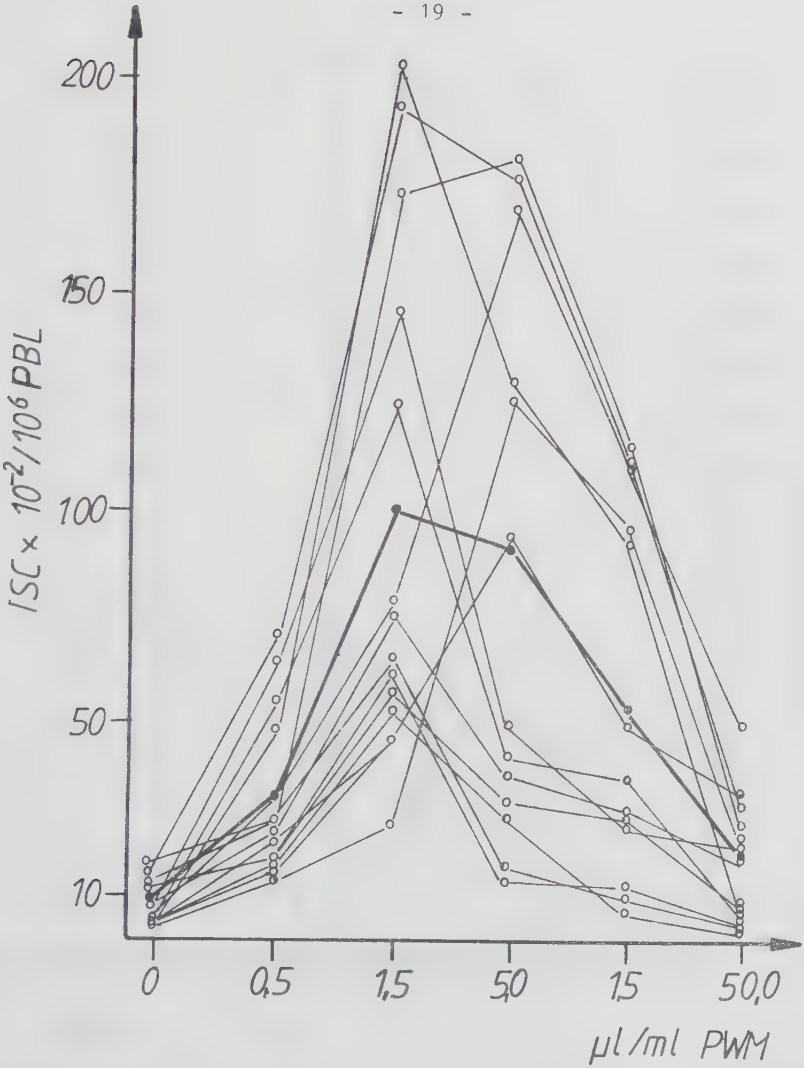

ABB.1: Dosiswirkungskurven der PWM-induzierten Differenzierung von B-Lymphozyten zu ISC 1 x 10^6 Zellen/ml wurden mit unterschiedlichen PWM-Konzentrationen inkubiert. Die Gesamtzahl der ISC wurde nach einer Inkubationsdauer von 7 Tagen bestimmt.
Die dicke Kurve verbindet die Durchschnittswerte $\bar{x}$ der ISC x $10^{-2}/10^6$ PBL für die unterschiedlichen PWM-Konzentrationen.

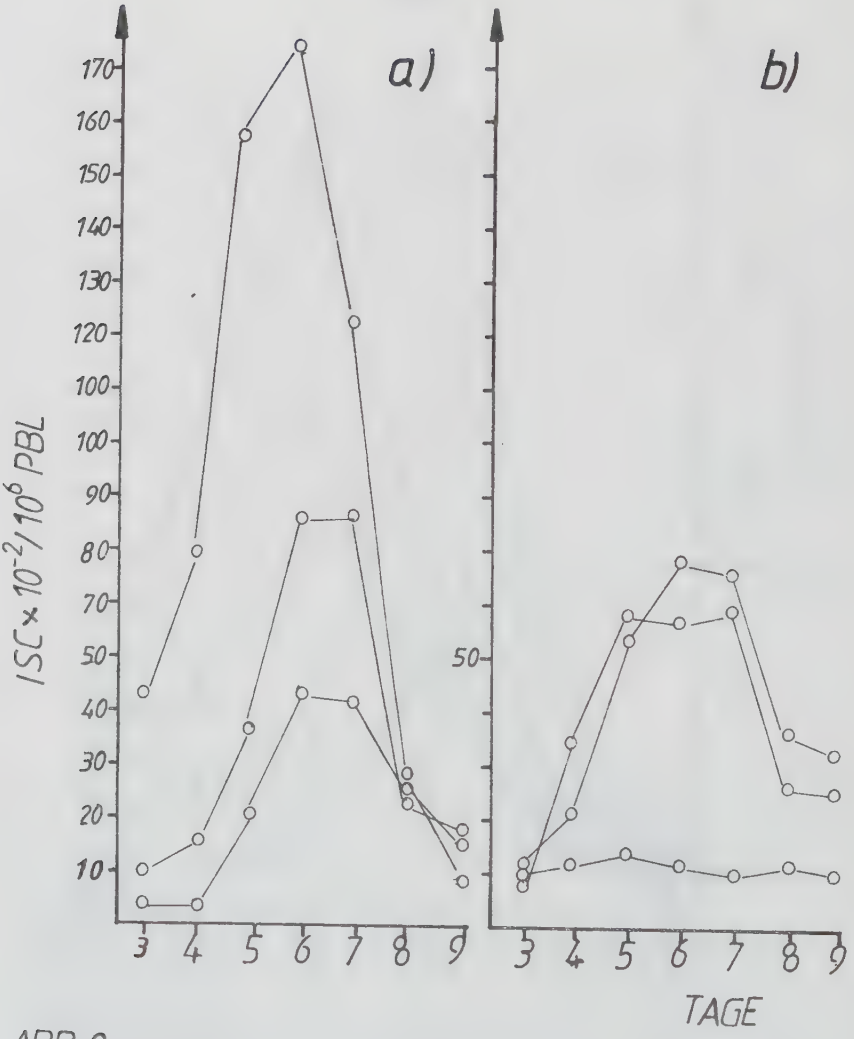

ABB. 2 : Kinetik der PWM induzierten Differenzierung von PBL in ISC. PBL von NP (a) und von HD-Patienten (b) wurden 3-9 Tage mit 1,5 bzw. 5,0 µl/ml PWM inkubiert.

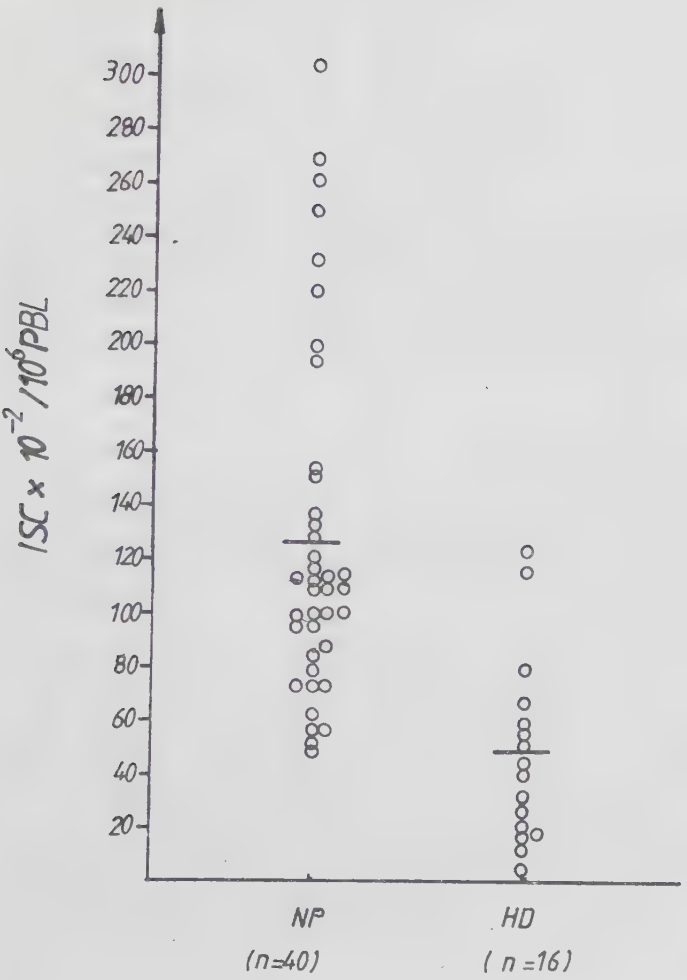

ABB. 3 : PWM-induzierte Differenzierung von peripheren B-Lymphozyten von NP und Patienten mit HD. Die Zellen wurden mit 5 µl/ml PWM inkubiert. Nach 6 oder 7 Tagen wurde die Anzahl der ISC bestimmt.
Die Querstriche markieren jeweils die Durchschnittswerte $\bar{x}$ der ISC x $10^{-2}/10^6$ PBL.

3.3. ISC bei Normalpersonen und Patienten mit HD

Abb. 3 gibt eine Übersicht über die PWM Stimulierbarkeit von B-Lymphozyten. In der HD-Gruppe ist die durchschnittliche Anzahl von ISC mit 4.800/10^6 Lymphozyten erheblich niedriger als in der Kontrollgruppe mit 12.600/10^6 Lymphozyten.

Die Streuung ist in beiden Gruppen groß. In der Gruppe der NP erreicht sie Werte zwischen 4.900 und 30.300 ISC/10^6 Lymphozyten, bei den HD-Patienten wurden Werte von 400 bis 12.300 ISC/10^6 PBL erreicht und nur 2 Patienten zeigten eine B-Lymphozytenaktivierung, die im Bereich des Durchschnittswertes der Kontrollgruppe lag.

3.3.1. Spontanplaques

Die spontane Immunglobulinsekretion wurde sofort nach Isolierung der PBL aus dem peripheren venösen Blut bestimmt als die Anzahl ISC pro 10^6 mononukleäre Zellen. Tab. 2 zeigt die spontane Anzahl ISC bei 6-HD-Patienten und 6 NP. Danach zeigen HD-PBL eine deutlich höhere Anzahl spontaner ISC als NP-PBL, während sich bei der PWM-induzierten Ig-Sekretion normale PBL deutlich besser stimulieren ließen (s. 3.3.). Bei einem HD-Patienten konnten wir die spontane Anzahl ISC der Milzlymphozyten bestimmen, dabei fanden wir keinen signifikanten Unterschied zur Anzahl der ISC der PBL desselben Patienten, auffällig ist jedoch der hohe Anteil IgM sezernierender Zellen. Da es sich hierbei jedoch um eine Einzelbestimmung handelt, läßt sich nicht sagen, ob dieser Beobachtung Bedeutung zukommt.

Tab. 2: Spontane Immunglobulinsekretion der peripheren Blutlymphozyten (PBL) bei 6 HD-Patienten und 6 Normalpersonen (Durchschnittsangaben ± Standardabweichung) sowie spontane Ig-Sekretion der Milzlymphozyten (ML) bei einem HD-Patienten.

Spontane ISC/10^6 Zellen			
	HD (PBL)	Kontrollen (PBL)	HD (ML)
Σ	915 ± 520	430 ± 140	690
α	403 ± 190	200 ± 106	180
γ	231 ± 120	34 ± 7,5	10
μ	211 ± 105	112 ± 44	530

Angegeben sind neben der Gesamtzahl ISC (Σ, hierbei sind IgA-, IgG- und IgM sezernierenden Zellen erfaßt), selektiv die IgA - (α), IgG - (γ) und IgM sezernierenden Zellen (μ).

3.4. Bestimmung von PBL-Subpopulationen mit monoklonalen Antikörpern

Bei 6 HD-Patienten wurden mit mAbs die relativen Anteile von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten sowie T-Subpopulationen (T-Helfer/Inducer-, T-Suppressorzellen, Natural Killer-Zellen) bestimmt. Die absoluten Zahlen wurden, bei bekannter Lymphozytenzahl und bekanntem Lymphozytenanteil rechnerisch bestimmt.
Tab. 3 gibt eine Übersicht der Ergebnisse. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse bei Patienten mit HD im Vergleich zu Normalpersonen findet sich in Tab. 4 und 5.
Diese Ergebnisse zeigen eine im Vergleich zu Normalpersonen signifikant niedrigere Anzahl zirkulierender Lymphozyten bei HD-Patienten infolge einer sowohl relativen als auch absoluten Erniedrigung der T-Lymphozyten (E_N-R). Bezüglich der Anzahl der B-Lymphozyten, sowohl relativ als auch absolut gesehen, fand sich keine Differenz zwischen HD-Patienten und Normalpersonen.
Bei Betrachtung der T-Subpopulationen zeigte sich kein signifi-

kanter Unterschied, sowohl was die relative wie auch die absolute Anzahl der T-Suppressor wie der T-NK/K-Fraktionen angeht. Eine wesentliche Differenz allerdings fand sich bei den T-Helferzellen, die bei den untersuchten Patienten sowohl absolut als auch relativ deutlich vermindert waren. Während sie anteilmäßig beim Normalkollektiv um 50% lagen, reichte ihr Anteil bei den HD-Patienten von 28% bis 33%. Damit erklärt sich auch die T-Lymphozytenverminderung als bedingt durch die T-Helferzellverminderung. Der Quotient von Helfer- zu Suppressorzellen (OKT 4/OKT 8) war entsprechend bei der Patientengruppe signifikant niedriger (bei NP ca. 1,9, bei HD-Patienten ca. 1,2).

Tab. 3: Übersicht der Bestimmung von PBL-Subpopulationen bei 6 HD-Patienten. Dabei entsprechen die B 1 positiven Zellen den B-Lymphozyten, die E_N-R positiven Zellen den T-Lymphozyten, die OKT 4 positiven Zellen den T-Helfer- und die OKT 8 positiven Zellen den T-Suppressorzellen. Leu 7 positive Zellen entsprechen den NK/K-Zellen.

Patient	R.D.	F.F.	W.W.	H.P.	P.G.	S.E.
Stadium	III B	IV A	III A	III A	II A	II A
Leukozyten	7000	8400	5800	5900	6400	4800
Lymphozyten in %	39	12	31	41	32	29
E_N-R in %	56	59	70	63	60	59
OKT 4 pos. Zellen in %	28	28	29	33	29	30
OKT 8 pos. Zellen in %	20	24	28	30	25	23
Leu 7 pos. Zellen in %	14	13	8	9	12	14
B 1 pos. Zellen in %	10	14	13	12	12	16

Tab. 4: Relative Zahlen von B- und T-Lymphozyten sowie T-Lymphozytensubpopulationen bei 6 HD-Patienten und 15 Normalpersonen (Durchschnittsangaben ± Standardabweichung).

	Normalpersonen %	HD-Patienten %
B-Lymph. (B 1)	10,8 ± 3,8	12,8 ± 1,86
T-Lymph. (E_N-R)	75 ± 4,9	61,2 ± 4,4
T-Helfer (OKT 4)	49 ± 6,8	29,5 ± 1,7
T-Suppressor (OKT 8)	26 ± 3,4	25 ± 3,3
NK/K-Zellen (Leu 7)	13,2 ± 3,6	11,7 ± 2,3

Tab. 5: Absolute Zahlen von B- und T-Lymphozyten sowie T-Lymphozyten-Subpopulationen bei 6 HD-Patienten und 15 Normalpatienten (Durchschnittsangaben ± Standardabweichung).

	Normalpersonen x 10^9/l	HD-Patienten x 10^9/l
B-Lymph. (B 1)	0,21 ± 0,10	0,23 ± 0,045
T-Lymph. (E_N-R)	1,53 ± 0,62	1,16 ± 0,30
T-Helfer (OKT 4)	0,99 ± 0,40	0,56 ± 0,18
T-Suppressor (OKT 8)	0,52 ± 0,20	0,47 ± 0,15
NK/K-Zellen	0,26 ± 0,12	0,22 ± 0,09
Gesamtzahl der Lymphozyten	2,02 ± 0,77	1,88 ± 0,6

3.5. Kokulturen

Nachdem HD-Patienten im RHPA gegenüber NP eine deutlich verminderte Anzahl ISC aufwiesen, wurden Kokulturen angesetzt, um möglicherweise eine Einsicht in die Mechanismen, die der verminderten Reaktion nach Stimulation bei HD-Patienten zugrundeliegen, zu bekommen.
In diesen Experimenten wurden die PBL unterschiedlicher Spender (PBL von NP_1 x PBL NP_2 o. PBL NP_1 x $PBL_{HD\text{-}Patient}$ usw.) in der Regel im Verhältnis 50:50 kokultiviert. Wenn andere Verhältnisse vorliegen, wird das ausdrücklich angegeben. Die inkubierten PBL wurden zum Teil unterschiedlich vorbehandelt, darauf wird in den nächsten Abschnitten eingegangen.
Wesentlich für alle Experimente, in denen Kokulturen angesetzt wurden, ist die Tatsache, daß stimulierende oder supprimierende Effekte auf ISC unabhängig sind von HLA-Identität oder -verschiedenheit (12, 94; Strelkauskas u.a. (84) fanden allerdings, wenn auch inkonstant, eine bessere Kooperation zwischen autologen T- und B-Lymphozyten bei der B-Zelldifferenzierung).
Aus der Zahl der ISC, die von den jeweiligen Einzelkulturen der Kokulturpartner (z.B. ISC einer NP A (N_A) x ISC eines HD-Patienten B (P_B) bekannt waren, wurde nach der Formel $N = \frac{1}{2}(N_A + P_B)$ ein Erwartungswert N errechnet. Erwarteter Wert (N) und der nach Kokultivieren tatsächlich gefundene Wert wurden dann verglichen.
Abb. 4 zeigt die Ergebnisse der Kokulturen mit PBL von NP und HD-Patienten. Während die bei Kokulturen zwischen Normalpersonen gefundenen Werte von kleineren Abweichungen abgesehen, den Erwartungswerten entsprechen, lag bei den Kokulturen mit PBL von NP und HD-Patienten der gefundene Wert insgesamt häufiger und mehr als 25% unter dem Erwartungswert. In 2 Fällen kam es zu einer ganz erheblichen Suppression der Reaktivität der PBL der Normalpersonen.

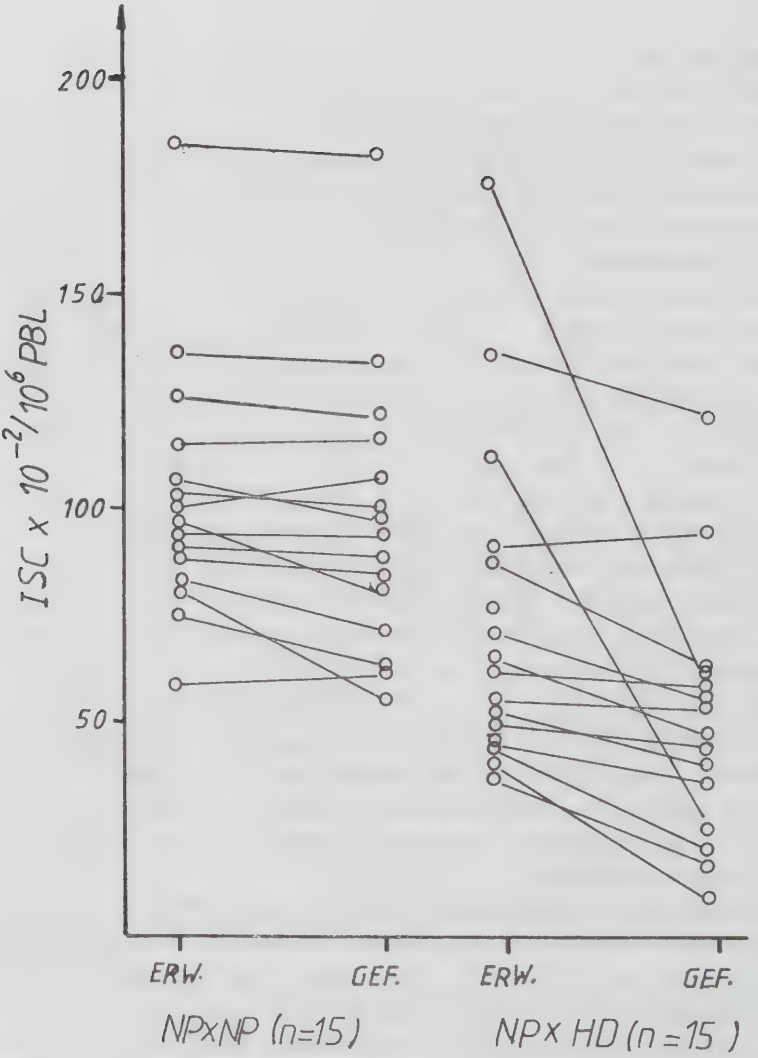

ABB. 4: PWM-induzierte Generierung von ISC.
Normale PBL wurden in Anwesenheit von PWM entweder mit den PBL einer anderen, HLA verschiedenen NP (NP x NP) oder mit den PBL eines HD-Patienten (NP x HD) jeweils im Verhältnis 1:1 kokultiviert.

Prinzipiell gibt es mehrere Möglichkeiten, die verminderte Stimulierbarkeit der B-Lymphozyten zu erklären, wie wir sie bei den PBL von HD-Patienten finden. Neben einem Defekt der T-Helferzellen wäre ein Defekt der B-Lymphozyten möglich; auch eine Hyperreaktivität der T-Suppressor-Zellen ist denkbar. Letzteres scheint zumindest in den beiden Fällen, wo Patienten-PBL in der Lage waren, die Reaktivität von normalen PBL weitgehend zu supprimieren, der Fall zu sein. Die Ursache für die verminderte Reaktionsfähigkeit der übrigen Patienten kann über diesen Weg (hyperreaktive Suppressorzellen) allein nicht erklärt werden, hier ist ursächlich eher an einen T-Helferzelldefekt zu denken.
Mit den folgenden Experimenten gingen wir der Vermutung nach, daß neben anderen Mechanismen eine vermehrte Suppression für die bei HD-Patienten vorgefundene verminderte Stimulierbarkeit der B-Lymphozyten zu ISC verantwortlich zu machen ist. Es wurden deshalb Kokulturen mit ConA-präinkubierten Modulatorzellen angesetzt, in einer weiteren Versuchsreihe Kokulturen mit Monozyten angereicherten Zellsuspensionen und schließlich Kokulturen mit getrennten B- und T-Lymphozyten, um auch der Möglichkeit eines Defekts der B-Zellen selbst oder eines T-Helferzelldefekts nachzugehen.

3.5.1. Kokulturen mit ConcanavalinA-präinkubierten Modulatorzellen

3.5.1.1. Vorversuche

Da in der Literatur unterschiedliche Angaben zur Behandlung von mit ConA präinkubierten PBL gemacht werden (72, 74, 75, 78), haben wir in Vorversuchen Modulatorzellen nach Präinkubation mit und ohne ConA und einmaligem Waschen zunächst mit und ohne Mitomycin inkubiert und anschließend alternativ mit RPMI 1640 medium oder 30 mM α-MDM jeweils dreimal gewaschen. Anschliessend wurden die, insgesamt auf 4 verschiedene Arten behandelten Modulatorzellen, mit frisch gewonnenen, HLA-nicht identen Effektorzellen E mit und ohne PWM in Kokulturen gebracht.

Die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs sind in Tab. 6 zu sehen. Wir haben diese Ergebnisse insgesamt dreimal reproduziert.
Aus Tab. 6 geht hervor, daß sich die Anzahl der ISC nicht unterscheidet, gleich ob mit Medium oder mit α-MDM gewaschen wurde, d.h. ConA wird auch durch mehrmaliges Waschen mit Medium von den Modulatorzellen entfernt. Weiter besteht kein Unterschied in den Resultaten bezüglich der 4 Behandlungsarten für die Kokulturen, deren Modulatorzellen nicht mit ConA präinkubiert wurden, also Kokulturen 1 und 2.
Erstaunlich ist die erhebliche Zunahme der ISC (bis zu 700%) bei den ConA stimulierten Modulatorzellen, die mit Mitomycin inkubiert wurden. Möglicherweise wird durch Mitomycin (DNA-Synthesehemmung) auch die durch ConA stimulierbare Synthese eines löslichen Faktors, der immunregulatorische Suppressorfunktion hat, blockiert.
In allen weiteren Versuchen mit ConA präinkubierten Modulator-Zellen haben wir die Zellen RPMI 1640 medium gewaschen und auf eine Inkubation mit Mitomycin verzichtet.

Tab. 6: Anzahl ISC /10^6 Lymphozyten bei PWM-stimulierten und unstimulierten Kokulturen mit Modulatorlymphozyten, die nach Präinkubation mit ConA (MConA) und ohne ConA(M) unterschiedlich (4 Gruppen) behandelt wurden.

Kokulturen \ Behandlung der Modulatorzellen	RPMI 1600 medium		αMDM 30 mM	
	ohne Mitomycin	mit Mitomycin	ohne Mitomycin	mit Mitomycin
E x M	200	200	200	200
(E x M) PWM	6300	5800	5500	5900
E x M_{ConA}	100	900	200	700
(E x M_{ConA}) PWM	1400	8500	1100	8100

3.5.1.2. Effekt von mit und ohne ConA präinkubierte Modulatorzellen von NP und Patienten mit HD auf normale Effektorzellen

a) Modifikation von unstimulierten Effektorzellen

Um einen möglichen unterschiedlichen Effekt von HD-Modulatorzellen und NP-Modulatorzellen auf die Ig-Produktion normaler unstimulierter Effektorzellen bestimmen zu können, wurden Kokulturen zwischen frisch isolierten Effektorzellen und mit und ohne ConA präinkubierten Modulatorzellen von NP und HD-Patienten angesetzt.
Die Ergebnisse sind in Abb. 5a für die ohne ConA präinkubierten Modulatorzellen und in Abb. 5b für die mit ConA präinkubierten Modulatorzellen zu sehen.
Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Kokulturen mit HD-Modulator- oder NP-Modulatorzellen, gleich, ob mit oder ohne ConA präinkubiert wurde. Es fand sich insbesondere keine signifikante Differenz bezüglich des ConA induzierten Suppressor-Effekts.

b) Modulation von PWM stimulierten Effektorzellen

Die mit und ohne ConA präinkubierten Modulatorzellen von NP und HD-Patienten wurden in diesen Versuchen mit frisch isolierten Effektorzellen 7 Tage lang in der Gegenwart von PWM kokultiviert.
Die Ergebnisse der PWM-stimulierten Kokulturen sind in Abb. 5c für die ohne ConA präinkubierten Modulatorzellen und in Abb. 5d für die mit ConA präinkubierten Modulatorzellen zu sehen. Mit diesen Versuchen läßt sich, wegen der infolge der PWM-Stimulation deutlich höheren Plaque-Zahlen, der Effekt der Modulatorzellen von NP mit dem von HD-Patienten mit und ohne ConA-Präinkubation besser vergleichen.

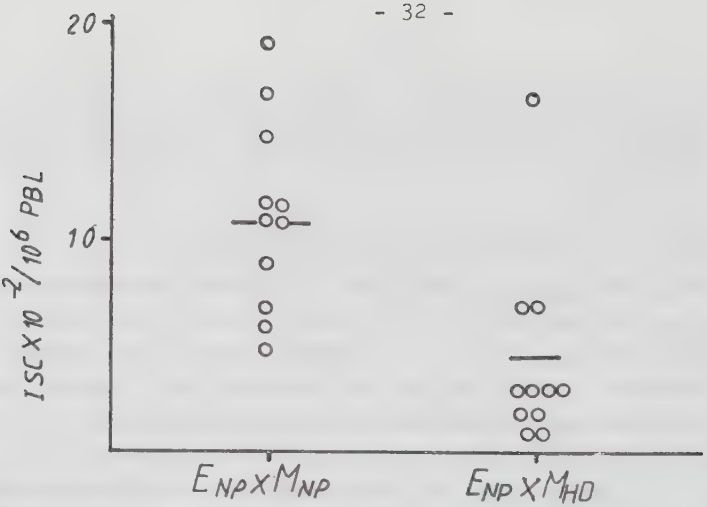

ABB. 5a: Anzahl der ISC nach Kokultur zwischen normalen Effektorzellen (E_{NP}) und 48 h präinkubierten Modulatorzellen von HLA-nicht identen NP (M_{NP}) oder HD-Patienten (M_{HD}) im Verhältnis 1:1.

Die Querstriche in den Abbildungen 5a-d markieren jeweils die Durchschnittswerte $\bar{x}$ der ISC x $10^{-2}/10^{6}$ PBL.

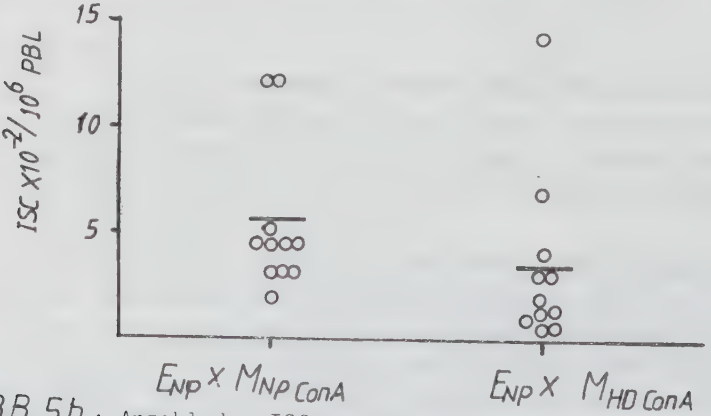

ABB. 5b: Anzahl der ISC nach Kokultur zwischen normalen Effektorzellen (E_{NP}) und 48 h ConA präinkubierten Modulatorzellen von HLA-nicht identen NP (M_{NPConA}) oder HD-Patienten (M_{HDConA}).

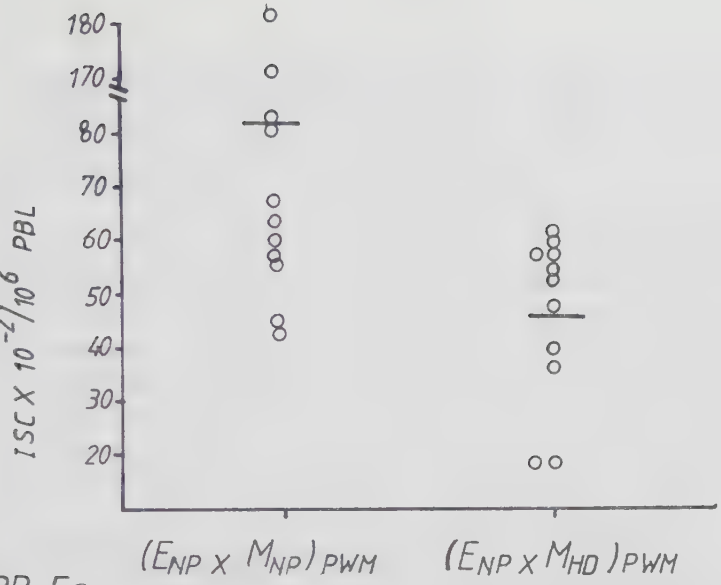

ABB. 5c : Anzahl der ISC nach Kokultur zwischen normalen, PWM stimulierten Effektorzellen (E_{NP}) und 48 h präinkubierten Modulatorzellen von HLA-nicht identen NP (M_{NP}) oder HD-Patienten (M_{HD}) im Verhältnis 1:1.

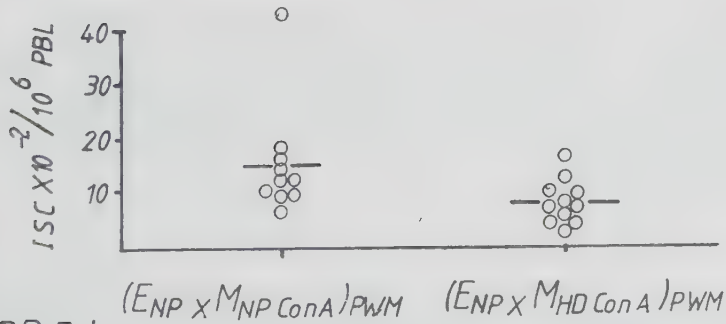

ABB. 5d : Anzahl der ISC nach Kokultur zwischen normalen, PWM stimulierten Effektorzellen (E_{NP}) und 48 h ConA präinkubierten Modulatorzellen von HLA-nicht identen NP (M_{NPConA}) oder HD-Patienten (M_{HDConA}).

Abgesehen von insgesamt niedrigeren Plaquezahlen (Mittelwert $\bar{x}$ = 83) bei den Kokulturen mit normalen, 48 Stunden präinkubierten Modulatorzellen, unterscheiden sich die Ergebnisse, wie sie in Abb. 5c festgehalten sind, nicht von den Kokulturen ohne Präinkubation (vgl. Abb. 4).
Ein Vergleich der Ergebnisse der Kokulturen mit ConA präinkubierten Modulatorzellen (Abb. 5d) mit denen, wo ohne ConA präinkubiert wurde (Abb. 5c) zeigt, daß die Gegenwart von ConA im Präkulturmedium regelmäßig zu einer erheblichen Herabsetzung der Plaquezahlen führt. Diese ConA induzierte Suppression der PWM-stimulierten Plasmazelldifferenzierung findet sich bei den Kokulturen mit HD-Modulatorzellen wie bei denen mit normalen Modulatorzellen. Tab. 6 faßt die Ergebnisse aus Abb. 5 a bis d zu Durchschnittsangaben $\pm$ Standardabweichung zusammen.
Daraus geht hervor, daß die von ConA induzierte Suppression durch Modulatorzellen von HD-Patienten nicht größer ist als die durch normale Modulatorzellen. In den PWM-stimulierten Kokulturen mit normalen, nicht ConA-präinkubierten Modulatorzellen und normalen Effektorzellen kommt es zu einem Durchschnittswert von 83 x 10^{-2} ISC/10^6 PBL pro Kultur; nach ConA-Präinkubation der Modulatorzellen kommt es unter sonst gleichen Bedingungen zu einem Durchschnittswert von 15 x 10^{-2} ISC/10^6 PBL, das entspricht 18% des ersten Wertes.
Die mit ConA präinkubierten HD-Modulatoren führten ebenfalls im Durchschnitt zu einer Suppression der PWM-stimulierten Plasmazelldifferenzierung auf 18%, bestimmt man die durchschnittliche Anzahl der ISC in den Kokulturen ohne ConA präinkubierte HD-Modulatoren zu 100%.

Tab. 7: Durchschnittsangaben der ISC/10^6 Lymphozyten ± Standardabweichung der Ergebnisse aus Abb. 5 a-d.

ko-kultivierte Zellen \ Kulturbedingungen	- PWM		+ PWM	
	- ConA	+ ConA	- ConA	+ ConA
M_{NP} x E	1100 ± 390	510 ± 330	3300 ±460	1500 ±940
M_{HD} x E	450 ± 440	330 ± 390	4600 ±680	810 ± 440

3.5.2. Kokulturen mit Monozyten

Um den supprimierenden Einfluß plastikadhärenter Zellen (Monozyten) von HD-Patienten auf die Differenzierung von PBL zu ISC zu untersuchen, wurden in einer Serie von 6 Experimenten Kokulturen angesetzt zwischen:

1. normalen PBL (NPA) und den Monozyten dieser Normalperson;
2. normalen PBL (NPA) und den Monozyten einer HLA-verschiedenen Normalperson B;
3. normalen PBL (NPA) und den Monozyten eines Patienten mit HD

Die PWM-induzierte Generierung von ISC wurde nach 7tägigem kultivieren mit 5 µl PWM pro ml Zellsuspension bestimmt. In jedem Versuch wurden neben normalen ungetrennten PBL Kokulturen zwischen monozytenreichen Zellsuspensionen (s. 2.9.) unterschiedlicher Spender (s.o.) und normalen ungetrennten PBL in folgenden Verhältnissen angesetzt: 90% PBL mit 10% Monozyten ($2{,}7 \times 10^6$ PBL x $0{,}3 \times 10^6$ Monozyten); 70% PBL mit 30% Monozyten ($2{,}1 \times 10^6$ PBL x $0{,}9 \times 10^6$ Monozyten) und 50% PBL mit 50% Monozyten ($1{,}5 \times 10^6$ PBL x $1{,}5 \times 10^6$).

Abbildung 6a zeigt den Einfluß wachsender autologer Monozyten-(M_{NPA})-Konzentrationen auf die Differenzierung von normalen Lymphozyten zu ISC. Die Durchschnittswerte $\bar{x}$ aus jeweils 6 Versuchen sind als Querstriche eingezeichnet. Es findet sich im Durchschnitt eine nur geringe Reduktion in der Anzahl der

ISC beim Verhältnis 90% PBL : 10% Monozyten, die dem Erwartungswert (90% der Anzahl der ISC bei PWM-Stimulation ungetrennter PBL) entspricht. Eine den Erwartungswert deutlich überschreitende Verminderung der ISC findet sich dagegen bei den Kokulturen mit Verhältnissen von 70% und 30% Monozyten sowie 50% PBL und 50% Monozyten. Im ersten Fall wird der durchschnittliche Erwartungswert von 70×10^{-2} ISC um mehr als 30%, im zweiten Fall wird der Erwartungswert von ca. 50×10^{-2} ISC im Durchschnitt um mehr als 50% unterschritten. Zusammenfassend kommt es nach den vorliegenden Ergebnissen bei steigender Konzentration autologer Monozyten zu einer zunehmenden Suppression der Differenzierung der PBL zu ISC.
Abbildung 6b zeigt den Einfluß wachsender allogener Monozytenkonzentrationen (M_{NPB}) auf die Differenzierung von normalen B-Lymphozyten zu ISC. Die Durchschnittswerte $\bar{x}$ aus jeweils 6 Versuchen sind als Querstriche eingezeichnet. Bei steigender heterologer Monozytenkonzentration findet sich ein zunehmender Abfall der Anzahl ISC. Der Abfall entspricht bei den Kokulturen mit 90% PBL_{NPA} und 10% N_{NPB} dem Erwartungswert. Bei den Kokulturen mit höheren Monozytenkonzentration (30% und 50%) kommt es jedoch zu einer Suppression der Differenzierung von PBL zu ISC. Der Erwartungswert wird im Durchschnitt in den Kokulturen mit 30% heterologen Monozyten um fast 40% unterschritten, in den Kokulturen mit 50% heterologen Monozyten um mehr als 50%.

Abbildung 6c gibt den Einfluß wachsender Monozytenkonzentrationen von HD-Patienten (M_{HD}) auf die Differenzierung normaler PBL zu ISC wieder. Wieder sind die Durchschnittswerte $\bar{x}$ als Querstriche eingezeichnet. Im Durchschnitt keine signifikante Abweichung der Anzahl von ISC vom Erwartungswert zeigt sich bei den Kokulturen mit Monozytenkonzentrationen von 10%.

Bei den Kokulturen mit 30% und 50% Monozytenanteil kommt es zu einer die Erwartungswerte signifikant unterschreitenden Verminderung der ISC: In den Kokulturen mit 30% Monozytenanteil wird der Erwartungswert um mehr als 40% unterschritten, in denen mit 50% Monozytenanteil um 60%.
In Abbildung 6d sind vergleichend anhand der Durchschnittswer-

te aus 6 Versuchen der Einfluß von 1. normalen, autologen 2. normalen, allogenen und 3. allogenen HD Monozyten in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen auf die Differenzierung von normalen PBL zu ISC zu sehen. Dabei zeigt sich als wichtigstes Resultat der Versuchsreihe, daß Monozyten von HD-Patienten bei jeweils gleichem Monozyten/Lymphozyten-Verhältnis die Differenzierung von normalen PBL zu ISC in etwa gleichem Ausmaß supprimieren wie Monozyten von Normalpersonen. Zumindest im RHPA als Testsystem findet sich also kein Anhalt für eine gegenüber normalen Monozyten signifikant gesteigerte suppressive Aktivität der Monozyten von unbehandelten Patienten mit aktivem HD, ebensowenig wie für eine verminderte monozytenvermittelte Suppression. Weiter zeigt sich eine den Kokulturen mit autologen Monozyten bzw. allogenen HD-Monozyten vergleichbare Suppression durch allogenen normale Monozyten. Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Versuche, daß das Ausmaß der Suppression von normalen PBL zu ISC durch Monozyten abhängig ist von der Monozytenkonzentration. Keine wesentlichen Unterschiede ergaben sich dagegen zwischen suppressiver Aktivität von allogenen, autologen und HD-Monozyten.

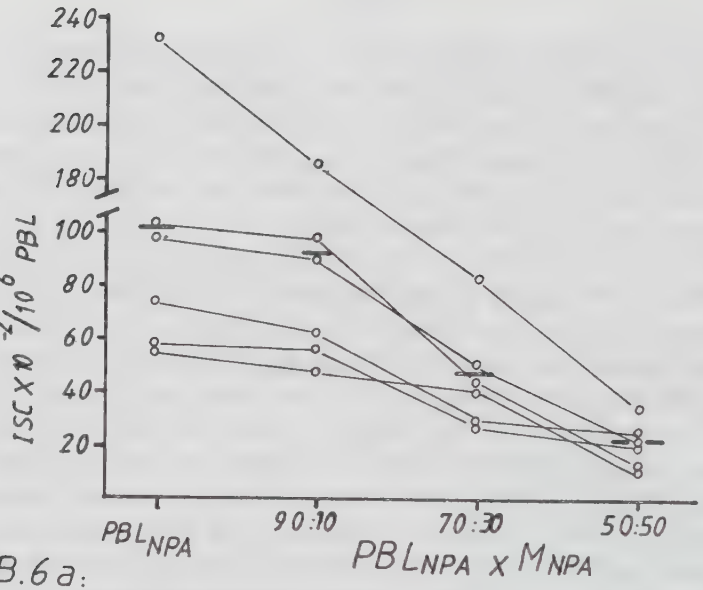

ABB. 6a:

Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen (10%, 30%, 50%) von Monozyten einer Normalperson A (M_{NPA}) auf die Differenzierung von B-Lymphozyten derselben Normalperson (PBL_{NPA}) in PWM-stimulierten Kokulturen.

Die Querstriche in den Abbildungen 6a-c markieren jeweils die Durchschnittswerte $\bar{x}$ der ISC x $10^{-2}/10^{6}$ PBL.

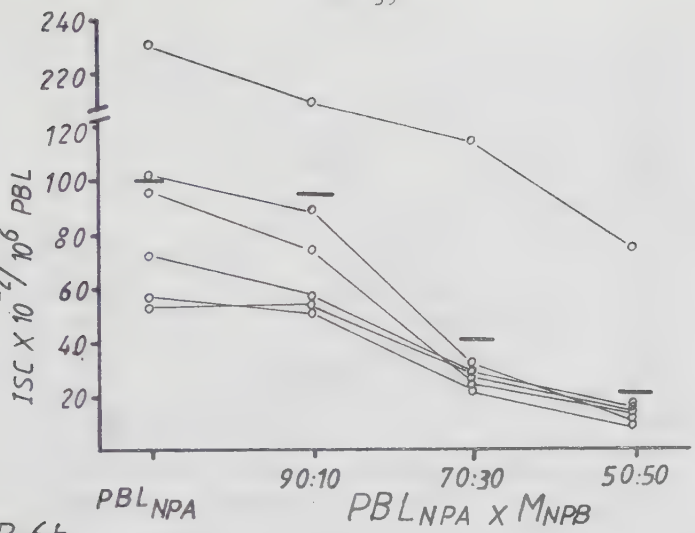

ABB. 6b :

Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen (10%, 30%, 50%) von Monozyten einer Normalperson B (M_{NPB}) auf die Differenzierung von B-Lymphozyten einer Normalperson A (PBL_{NPA}) in PWM-stimulierten Kokulturen.

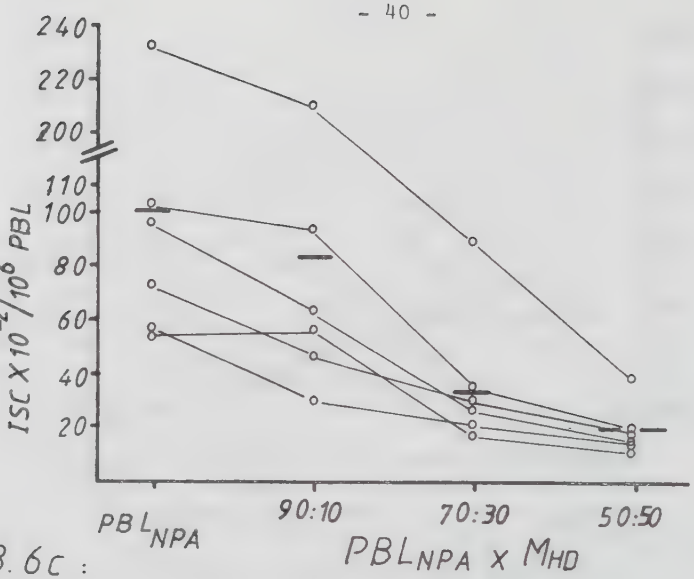

ABB. 6C :

Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen (10%, 30%, 50%) von Monozyten eines Patienten mit HD (M_{HD}) auf die Differenzierung von B-Lymphozyten einer Normalperson A (PBL_{NPA}) in PWM-stimulierten Kokulturen.

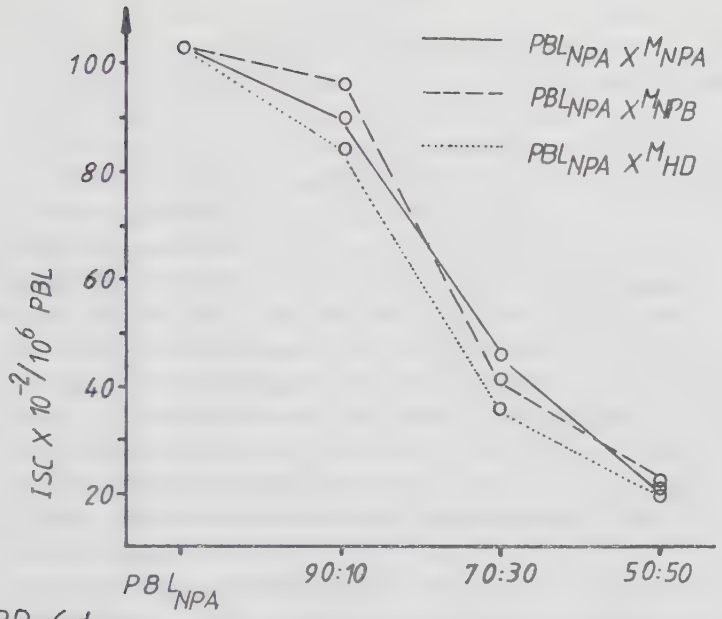

ABB. 6d : Zusammenfassender Vergleich des Einflusses unterschiedlicher Monozytenkonzentrationen (10%, 30%, 50%) von:
einer Normalperson A _____
einer Normalperson B ----------
einem Patienten mit Hodgkin's Disease .....
auf die Differenzierung der B-Lymphozyten der Normalperson A in PWM-stimulierten Kokulturen.

3.5.3. Kokulturen mit E-Rosetten-getrennten peripheren B- und T-Lymphozyten

Wir konnten weder nach ConA-Stimulation eine gesteigerte Suppressoraktivität bei HD-PBL im Vergleich zu normalen PBL beobachten, noch Hinweise für eine gesteigerte monozytenvermittelte Suppression der Ig-Produktion bei HD-Patienten finden. Bei den Immunmarkerbestimmungen der Lymphozytensubpopulationen ergab sich eine deutliche absolute Erniedrigung der OKT 4-positiven Zellen. In den Kokulturen zwischen normalen PBL und HD-PBL (vgl. Abb. 4) fanden wir fast regelhaft eine signifikante Erniedrigung der ISC unter den Erwartungswert, in zwei Fällen um mehr als 75%. Die Möglichkeit, daß die regelhafte Erniedrigung der ISC in Kokulturen mit HD-PBL über (evtl. nicht durch ConA induzierbare) Suppressorzellen vermittelt ist, bleibt prinzipiell bestehen. Als weitere Ursachen dafür kommen, auch nahegelegt durch die Immunmarkeruntersuchungen, ein Defekt der T-Helferzellen wie auch ein intrinischer B-Zelldefekt, wie ihn Rühl u.a. (69) bei zwei HD-Patienten nachgewiesen haben, in Betracht. Um zwischen diesen Möglichkeiten besser unterscheiden zu können, haben wir Kokulturen mit E-Rosetten getrennten T- und B-Lymphozyten angesetzt. Dabei wurden normale B-Lymphozyten (N_B) mit normalen T-Lymphozyten (N_T) und mit HD-T-Lymphozyten (P_T) jeweils im Verhältnis 30:70 und 50:50 kokultiviert. Entsprechend wurden HD-B-Lymphozyten (P_B) mit normalen - (N_T) und HD-T-Lymphozyten (P_T) in den gleichen Verhältnissen kokultiviert.

In Experiment III (Tab. 8) wurden normale B-und T-Lymphozyten mit den B- und T-Lymphozyten eines HD-Patienten kokultiviert, dessen PBL in den ungetrennten Kokulturen die Ig-Produktion massiv supprimiert hatten (s.o.).

Tab. 8 gibt eine Übersicht unserer Resultate. Für einen Defekt der B-Zellen selbst findet sich in allen Experimenten kein Anhalt, die HD-Zellen sind in Anwesenheit von normalen T-Zellen aktivierbar. Auffällig ist in den Experimenten I und II die deutliche Minderstimulierbarkeit normaler B-Zellen durch HD-T-Zellen, werden diese im Verhältnis 50:50 kokultiviert; weiter

die Erhöhung der HD-ISC (im Experiment II sehr deutlich) durch normale T-Lymphozyten. Beides spricht nach unserer Ansicht am ehesten für einen T-Helferzelldefekt bei HD, die Möglichkeit einer gesteigerten Suppressorzellaktivität der HD-T-Lymphozyten kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, ebensowenig daß es sich ursächlich um ein quantitatives Problem handelt: möglicherweise um die bei den Immunmarkeruntersuchungen gefundene, absolute periphere Erniedrigung der T-Helferzellen.
In Experiment III wurde die PWM-Stimulierbarkeit normaler B-Lymphozyten durch HD-T-Lymphozyten massiv supprimiert. Die höhere Anzahl ISC beim 50:50 Inkubationsverhältnis erklärt sich durch die höhere Anzahl normaler B-Lymphozyten. Umgekehrt kam es zu einer deutlichen Erhöhung der Stimulierbarkeit der HD-B-Lymphozyten durch normale T-Lymphozyten. Gegenüber den Experimenten I und II fällt die bedeutend massivere Suppression der Stimulierbarkeit normaler B-Lymphozyten durch HD-T-Lymphozyten auf.
Eine Klärung, ob diese Suppression durch HD-T-Lymphozyten über einen T-Helferzelldefekt oder hyperaktive T-Suppressorzellen bzw. von diesen Zellen sezernierte Mediatoren verursacht wird, wäre beispielsweise möglich mittels Kokulturen mit isolierten T-Helfer- bzw. T-Suppressorlymphozyten. Die experimentellen Möglichkeiten zur Isolation von T-Lymphozytensubpopulation standen uns jedoch nicht zur Verfügung.

Tab. 8: PWM induzierte Generation von ISC in Kokulturen mit Lymphozytensubpopulationen von NP und HD-Patienten

	Exp. I	Exp. II	Exp. III
Ungetrennte PBL: (PWM stimuliert)			
N	9.700	15.000	15.000
P	4.300	7.500	800
getrennte PBL: (PWM stimuliert)			
N_B x N_T			
30 : 70	11.300	9.000	9.000
50 : 50	15.600	16.000	16.000
N_B x P_T			
30 : 70	9.300	11.800	1.700
50 : 50	10.000	9.300	2.800
P_B x P_T			
30 : 70	4.000	7.300	200
50 : 50	3.400	6.000	500
P_B x N_T			
30 : 70	4.800	10.700	1.700
50 : 50	4.100	14.300	3.000

N: Normalperson P: HD-Patient

Isolierte B- und T-Zellen allein waren durch PWM nicht stimulierbar.

4. Diskussion

Immunantworten werden durch ein komplexes System stimulierender und supprimierender Einflüsse geregelt. Lymphozyten und Makrophagen/Monozyten sezernieren eine Reihe von Produkten (verschiedene Mediatoren, Interferon, Prostaglandine, Immunglobuline), die alle bei der Begrenzung der normalen Immunreaktion eine Rolle spielen; Immunglobuline z.B. über einen konzentrationsabhängigen Feedback-Mechanismus: sezernierte Ig konkurrieren mit Lymphozytenrezeptoren um ein bestimmtes Antigen und limitieren so die antigeninduzierte klonale Expansion. Auf zellulärer Ebene, d.h. durch direkten Zell-Zellkontakt spielen neben T-Suppressorzellen Makrophagen/Monozyten eine wesentliche Rolle bei der Begrenzung von Immunantworten.

Im normalen Verlauf einer Immunreaktion werden wahrscheinlich sowohl T-Helfer- als auch T-Suppressorzellen aktiviert und auf noch wenig verstandene Weise von Makrophagen/Monozyten wie sezernierten Produkten (s.o.) in ihrer Aktivität moduliert. Bei der normalen Immunantwort muß man also eine komplexe Balance zwischen "Hilfe und Suppression" annehmen. Entsprechend reflektiert im Falle der humoralen Immunantwort die Anzahl ISC die Balance zwischen Hilfe und Suppression. Das heißt, jede Imbalance im Verhältnis von T-Helfer- und T-Suppressorzellen und ihrer komplexen Modulation kann zur Ig-Suppression wie zu exzessiver Ig-Produktion führen.

Dadurch wird weiter deutlich, daß der RHPA als Testsystem (s.a. Einleitung) direkt v.a. die funktionellen Aspekte der B-Lymphozytendifferenzierung erfaßt, als indirektes Testsystem jedoch auch die T-Zell-vermittelte-Suppression und -hilfe. Daß die PWM-induzierte B-Zellaktivierung an das Vorhandensein von T-Helferzellen gebunden ist, ist in der Literatur umfangreich belegt (16, 23, 36, 77). Den Ergebnissen von Insel und Merler (36) zufolge wird die T-zellabhängige, PWM-induzierte B-Zellaktivierung durch einen von den T-Helferzellen produzierten Faktor vermittelt.

Weitgehend unklar in ihrer Wertigkeit und ihrem Zusammenspiel

sind auch die Mechanismen, die zur T-zellvermittelten humoralen Immunsuppression führen. Moretta u.a. (54) konnten einen Mediator nachweisen, der offenbar mit T-Helferzellen so interagiert, daß es zu einer Suppression der T-Helfer vermittelten B-Zelldifferenzierung kommt. Rich und Pierce (62) zeigten, daß ConA aktivierte T-Zellen einen Mediator produzieren, der die B-Zelldifferenzierung supprimiert. Eckstedt u.a. (12) spezifizierten, daß die ConA aktivierten Zellen nur die T-Helfer abhängige B-Zelldifferenzierung supprimieren, also nicht direkt mit den B-Lymphozyten interagieren. Lobo und Spencer (50) konnten darüber hinaus zeigen, daß mehrere T-Zellsysteme bei immunsuppressiven Vorgängen beteiligt sind und daß ConA aktivierte T-Zellen, die die B-Zellaktivierung zu ISC unterdrücken, strahlenempfindlich sind, während ConA aktivierte Zellen, die die T-Zellproliferation hemmen nicht strahlensensibel sind. Kadish u.a. (41) wiesen nach, daß ConA aktivierte Zellen Interferon freisetzen, das die T-Zellproliferation hemmt (38). Schließlich kann offenbar auch über direkten Zell-Zellkontakt T-Zellsuppression vermittelt werden (35).
Eine wesentliche Rolle bei der Immunregulation kommt den Makrophagen/Monozyten zu. Rosenberg und Lipsky (65, 66, 67) sowie de Vries u.a. (91) konnten zeigen, daß die Differenzierung von B-Zellen zu ISC unter PWM-Stimulation monozytenabhängig ist. Rosenberg und Lipsky postulieren dabei eine direkte Zell-Zell-Interaktion von adhärenten Zellen mit PBL (67). In weiteren Untersuchungen (65, 66) konnten sie zeigen, daß zumindest zum Teil die PWM-induzierte Generation von ISC von einem von Monozyten sezernierenden Faktor abhängig ist, bei dem es sich offenbar um Interleukin 1 handelt. Sie kommen zum Ergebnis, daß zur Differenzierung von B-Zellen sowohl intakte Monozyten als auch die Sezernierung eines löslichen Faktors (Interleukin 1) notwendig sind. Zur PWM-induzierten PBL-Proliferation dagegen sind nur intakte Monozyten nötig, nicht dagegen Interleukin 1.

Twomey (89) hat die "Helfer"-Rolle der Monozyten/Makrophagen bei der Immunantwort hypothetisch als Sequenz dreier Phasen zusammengefaßt: Phase A: Präsentation des immunogenen Antigens durch Makrophagen; Phase B: Expansion der Makrophagenpartizi-

pation an der Immunantwort durch aktivierte Lymphozyten; Phase C: Beteiligung von Mediatoren.

Die zelluläre Kooperation zwischen Lymphozyten und Makrophagen ist sowohl für die Induktion der Immunantwort als auch für ihre Suppression notwendig (90). Monozyten und/oder von ihnen produzierte Faktoren können sowohl die T-Zellproliferation als auch die Differenzierung von B-Zellen zu ISC supprimieren (3, 24, 45, 48, 49, 56, 60, 83). Dabei lassen sich wenigstens zwei monozytenvermittelte Suppressorsysteme in vitro sicher unterscheiden: eines funktioniert offenbar über die Freisetzung von Prostaglandin E_2 und kann durch Indomethacin genommt werden (42, 56, 60), das andere erfordert intakte, lebende Monozyten und ist resistent gegen Indomethacin (24, 52, 60). Weiter scheint das Ausmaß der monozytenvermittelten Suppression proportional zur Monozytendichte in den entsprechenden Kokulturen zu sein (48).

Analog der Klassifizierung bei den Lymphozyten schlägt Twomey trotz unzureichenden Verständnisses von Monozytensubpopulationen und fehlenden unterscheidenden Oberflächenmarkern, aus heuristischen Gründen die Differenzierung in Helfer- und Suppressormonozyten vor (89). Der vorherrschende "Suppressor"-Monozyt läßt sich, folgt man dieser Terminologie, durch nachstehende Eigenschaften charakterisieren (48, 60): er ist an fremden Oberflächen adhärent, reich an cytoplasmatischer Esterase, supprimiert nur als lebende Zelle, ist ausgesprochen widerstandsfähig, d.h. bleibt auch nach langer Kulturdauer aktiv und ist nicht steroidempfindlich.

Zusammenfassend erweisen sich also T-Lymphozyten und Makrophagen/Monozyten sowie nur zum Teil näher bestimmte, von diesen Zellen sezernierte Faktoren für den physiologischen Vorgang der Begrenzung oder Suppression der Immunantwort verantwortlich.

Die Liste der Erkrankungen, die primär auf einem Immundefekt beruhen, bei denen eine immunpathologische Genese diskutiert wird oder bei denen es sekundär zu pathologischen Immunantworten kommt, ist lang (82). Bei Patienten mit M. Hodgkin ist, wie in der Einleitung ausgeführt, vor allem die zellvermittel-

te Immunantwort beeinträchtigt, dagegen finden sich in der Regel normale Immunglobulinspiegel. Die Ursache der Immunsuppression bei HD scheint komplex zu sein. In der Literatur werden neben monozytenvermittelter auch eine T-zellvermittelte Suppression (76, 79) ursächlich angenommen, weiter eine Verminderung ode Dysfunktion der T-Helfersubpopulation und auch kombiniert z.B. eine sowohl T-zell- als auch monozytenvermittelte Suppression (26, 33, 69, 76, 87). Nicht zu vergessen ist, daß die verschiedenen, an der Immunsuppression beteiligten Systeme ganz unterschiedlich in ihrer Spezifität sind: das Spektrum reicht von relativ unspezifischen Suppressionseffekten bis zu sehr begrenzten spezifischen wie der Idiotypen-Suppression.

Wir konnten zeigen (vgl. 3.3), daß die überwiegende Anzahl der Patienten mit HD in vitro einen schweren Defekt der Differenzierung von peripheren B-Zellen zu ISC aufweisen. Verantwortlich dafür könnten sein: (1) eine Reduktion der absoluten peripheren B-Zellanzahl, (2) ein intrinsischer B-Zelldefekt, (3) ein T-Helferzelldefekt, (4) eine quantitative Imbalance von T-Helfer- zu T-Suppressorzellen, (5) hyperreaktive T-Suppressorzellen, (6) hyperreaktive oder in ihrer absoluten Anzahl vermehrte supprimierende Monozyten.
Diese Möglichkeiten (und damit sind natürlich nicht alle Möglichkeiten erfaßt) sollen im folgenden anhand der experimentellen Ergebnisse diskutiert werden.

4.1. PBL-Subpopulationen bei Patienten mit HD

Nach unseren Ergebnissen (vgl. 3.4.) zeigen Patienten mit aktivem HD eine absolute Reduktion der PBL, die vor allem auf eine relative wie absolute Erniedrigung des Anteils der OKT 4 positiven Zellen (T-Helferzellen) zurückzuführen ist. Bezüglich der Anzahl der B-Lymphozyten fand sich kein Unterschied zwischen HD-Patienten und Normalpersonen. Vergleichbare Ergebnisse haben Romagnani u.a. (64) gefunden, allerdings mit anderen Immunmarkern (Tμ und Tγ). In diesem Zusammenhang interessant sind die Ergebnisse von Herrmann u.a. (31), die bei HD-

Patienten in klinischer Remission eine relative Zunahme von B-, T-Helfer- und T-Suppressorzellen gegenüber Patienten mit aktiven M. Hodgkin fanden; insbesondere war bei diesen Patienten die B-Zellpopulation größer als bei normalen Kontrollpersonen. Herrmann u.a. schreiben diese Verschiebung der PBL-Subpopulationen dem Langzeiteffekt der Strahlen und/oder Chemotherapie dieser Patienten zu. Weiter fanden sie im Unterschied zu den PBL-Subpopulationen in Milzzellsuspensionen von HD-Patienten eine signifikante Erhöhung der T-Helferzellen und eine deutliche Minderung der T-Suppressorzellen. Weder bei Normalpersonen noch bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen zeigte sich diese T-Helferimbalance zwischen Milzlymphozyten und PBL.
Einschränkend ist zur Aussagekraft der Immunmarkeruntersuchungen allerdings zu sagen, daß OKT 4 - oder OKT 8 positive Zellen nicht streng mit funktionellen T-Helfer- bzw. T-Suppressorzellen korrelieren. Mit mAbs können zwar zellspezifische Oberflächenantigene bestimmt werden und damit ist eine subtile morphologische Diagnostik möglich, allerdings können keine funktionellen Defekte erfaßt werden, zumindest solange ein funktioneller Zelldefekt nicht zu einer Alteration der Zelloberflächenantigene führt.
Aufgrund der Markeruntersuchungen können wir eine Verminderung der absoluten peripheren B-Zellanzahl als Ursache der gestörten Reaktivität der HD-B-Zellen ausschließen. Rühl u.a. (69) halten diese Möglichkeit als Erklärung ebenfalls für unwahrscheinlich, allerdings ohne Immunmarkeruntersuchungen durchgeführt zu haben. Die Immundefizienz bei HD wird von ihnen als komplex und variabel beschrieben; sie machten ursächlich sowohl eine Hyperreaktivität der Suppressorzellen, einen intrinsischen B-Zelldefekt wie einen T-Helferzelldefekt für die gestörte Immunregulation bei HD-Patienten verantwortlich.

Der T-Helferzelldefekt könnte nach unseren Ergebnissen auch auf der absoluten peripheren Erniedrigung der OKT 4 positiven Zellen beruhen. Erschwert wird dieser einfache Schluß durch die offenbar bestehende Imbalance zwischen peripheren und milzständigen T-Helferzellen bei HD-Patienten (31), die eher einen funktionellen T-Helferdefekt nahelegt. Wir sind der

Möglichkeit eines T-Helferdefekts mit Kokulturen zwischen isolierten HD-B-Zellen und isolierten normalen T-Zellen sowie isolierten normalen B-Zellen und isolierten HD-T-Zellen weiter nachgegangen (vgl. 4.4.).

4.2. Concanavalin A induzierte Suppression bei HD-Patienten und Normalpersonen

In der Literatur ist umfangreich belegt, daß durch ConA T-Suppressorzellen induziert werden (10, 19, 25, 28, 47, 71) und weiter, daß diese T-Suppressorzellen offenbar über einen Mediator die B-Zelldifferenzierung hemmen (12, 41, 54, 62). Dabei scheinen ConA aktivierte Zellen mindestens zwei niedrigmolekulare unterschiedliche Mediatoren zu sezernieren, von denen einer die B-Zelldifferenzierung direkt supprimiert (19), während der andere T-Zellen supprimiert (28).
ConA induziert nur bei Konzentrationen von wenigstens 10 µg/ml Zellsuspension und Inkubationszeiten von mehr als 24 h T-Suppressorzellen; bei geringeren ConA-Konzentrationen und kurzen Inkubationszeiten (6 - 24 h) werden T-Helferzellen induziert (47). Die ConA generierten T-Suppressorzellen sind Mitomycin- (47) und Corticosteroidempfindlich (10) und interagieren mit der frühen Phase der B-Zelldifferenzierung, nicht mit dem letzten Differenzierungsschritt zu ISC (47). Weiter ist die ConA-induzierte Suppression in Kokulturen HLA-unabhängig (10, 74, 78).
Mit den von uns durchgeführten Experimenten haben wir versucht, auf indirektem Weg im RHPA-Testsystem der Frage nachzugehen, ob bei HD-Patienten im Vergleich zu NP eine Population abnormer T-Zellen existiert, die durch ConA stimuliert zu einer exzessiven Suppressoraktivität führt.
In Vorversuchen konnten wir in Übereinstimmung mit Kuritani u.a. (47) die Mitomycinempfindlichkeit der ConA-induzierten T-Suppressorzellen zeigen. Wurden ConA-präinkubierte Modulatorzellen anschließend mit Mitomycin inkubiert, kam es zu einer Aufhebung der ConA-induzierten Suppression (s. 3.5.1.1.).
Interessanterweise kam es (die Versuchsergebnisse sind nicht

aufgeführt) nach Bestrahlung der ConA präinkubierten Modulatorzellen mit 5000 rad ebenfalls zu einer Aufhebung der Suppression. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß die ConA-induzierten T-Suppressorzellen über Mediatoren immunsuppressiv wirksam werden (s.a. 12, 41, 54, 62), da es durch Mitomycin zu einer Blockierung der für die Zellteilung notwendigen Reduplikation kommt. Weiter haben wir in Vorversuchen, die ConA-präinkubierten Modulatorzellen mit α-MDM (α-MDM konkurriert kompetitiv mit ConA um den entsprechenden Oberflächenrezeptor) gewaschen, um an die Zelloberflächen gebundenes ConA zu entfernen (4, 62). Da kein Aktivitätsunterschied zwischen mit α-MDM und mit RPMI 1640 medium gewaschenen Modulatorzellen zu beobachten war, ist davon auszugehen, daß die Bindungsstärke zwischen ConA und dem entsprechenden Zelloberflächenrezeptor nicht sehr groß ist. Die Tatsache, daß durch Mitomycin die durch ConA induzierte Suppression aufgehoben wird, ist für die weitere Diskussion von Belang, da sich dadurch differente Resultate in der Literatur besser verstehen lassen.

Unsere Ergebnisse (s. 3.5.1.2.) zeigen den immunmodulatorischen Effekt von mit und ohne ConA präinkubiertem PBL von NP und HD-Patienten auf die PWM-induzierte Ig-Produktion von frisch isolierten PBL. In Übereinstimmung mit Schwartz u.a. (74) fanden wir eine deutliche Suppression der Ig-Produktion durch ConA-präinkubierte normale PBL in allen Kokulturen mit normalen PBL. Sieber u.a. (78) dagegen fanden keine signifikante Suppression der Ig-Produktion in Kokulturen mit ConA-präinkubierten PBL im Vergleich zu PWM stimulierten Monokulturen. Der Grund für diese Diskrepanz liegt nach unseren Ergebnissen (s.o.) in der unterschiedlichen Nachbehandlung der ConA-präinkubierten Zellen. Während wir auf eine Mitomycin-Nachbehandlung (ebenso wie Schwartz u.a.) verzichtet haben, wurden die mit und ohne ConA präinkubierten Modulatorzellen von Sieber u.a. mit Mitomycin behandelt.

Weiter fanden wir in allen Kokulturen eine deutliche Suppres-

sion der PWM stimulierten Ig-Produktion durch ConA-präinkubierte PBL von HD-Patienten. In Prozenten ausgedrückt entsprach die Suppression durch ConA-präinkubierte HD-Modulatorzellen jedoch genau der durch normale ConA-präinkubierte Modulatorzellen (jeweils 82%), d.h. zumindest im RHPA-Testsystem, also in vitro, findet sich kein Anhalt für die vermehrte Existenz ConA-induzierbarer, hyperreaktiver Suppressorzellen bei HD-Patienten.

Die Ergebnisse von Rühl u.a. (68) waren mit Anlaß zu den vorliegenden Untersuchungen, da sie bei PBL von HD-Patienten im aktiven Stadium eine ConA-vermittelte, deutliche Reaktivitätserhöhung (Reaktivitätsbestimmung mittels ^{3}H-Td-Einbau) zeigen, dagegen eine Reaktivitätsverminderung bei HD-Patienten in Remission und normalen Kontrollen. Daraus schlossen sie auf die Existenz einer Suppressorzellpopulation, die möglicherweise mit für die Abnormalitäten der T-Zellfunktion, wie sie bei HD in vitro gefunden werden, verantwortlich ist, insbesondere für die herabgesetzte, mitogen-induzierte (PHA) Proliferation der PBL von HD-Patienten. Aufgrund dieser Ergebnisse hatten wir im RHPA-Testsystem eine gesteigerte supprimierende Aktivität der HD-Modulatorzellen erwartet. Es ist allerdings zu beachten, daß neben der unterschiedlichen Fragestellung - bei Rühl u.a. ging es um die ConA-Stimulierbarkeit von HD-PBL, die über die Menge des Thymidineinbaus bestimmt wurde, bei unseren Untersuchungen um den Einfluß von ConA-präinkubierten HD-Modulatorzellen auf die Ig-Produktion - methodisch auch insofern ein Unterschied bestand, als Rühl u.a. die PBL zunächst 7 Tage ohne Mitogen präinkubierten und erst danach mit ConA inkubierten, während wir Kokulturen zwischen ConA-präinkubierten (48 h) Modulatorzellen und frisch gewonnenen PBL ansetzen. Die Ergebnisse von Rühl u.a. und unsere Ergebnisse zusammenfassend läßt sich sagen, daß durch ConA bei Patienten mit aktiven M. Hodgkin in vitro gesteigert Suppressorzellen induziert werden, die jedoch im RHPA im Vergleich zu normalen ConA präinkubierten Modulatorzellen zu keiner gesteigerten Suppression der Ig-Produktion führen. Denkbar wäre, da - wie eingangs erwähnt - ConA aktivierte Zellen mindestens zwei Mediatoren sezernieren, von denen der eine die B-Zelldifferenzierung direkt supprimiert, der andere

dagegen T-Zellen supprimiert, daß bei aktivem HD eher der T-Zell-supprimierende Mediator in unphysiologischen Mengen sezerniert wird, was auch mit der Tatsache, daß bei HD vor allem die zellvermittelte Immunreaktion herabgesetzt ist, korrelieren würde.
Die Ergebnisse von Schulof u.a. (72) zeigen im Gegensatz zu unseren Ergebnissen bei 35% der von ihnen untersuchten HD-Patienten keine Generierung von ConA induzierter Suppressoraktivität und bei den übrigen nur eine subnormale. Jedoch wurden von ihnen die PBL nur 24 h präinkubiert, was möglicherweise nicht ausreicht, um Suppressorzellen zu generieren (47) und weiter wurden die ConA-präinkubierten Zellen mit Mitomycin nachbehandelt und das führt, wie wir zeigen konnten, zu einer Aufhebung der ConA-induzierten Suppression.

4.3. Monozyten induzierte Suppression bei HD-Patienten und Normalpersonen

Wie bereits skizziert, ist es experimentell gut belegt, daß Monozyten bei der Regulation von Immunvorgängen eine wesentliche Rolle zukommt; die dabei beteiligten Mechanismen sind jedoch nur unzureichend bekannt. Entsprechend sind Monozyten auch bei der Dysregulation von Immunvorgängen beteiligt. So konnten Burns u.a. (4) im RHPA bei 15 Patienten mit immunpathologischen Erkrankungen (SLE, chronisch aktive Hepatitis vom Autoimmuntyp, M. Crohn, Colitis ulcerosa) eine Monozytenvermittelte Suppression der spontanen Ig-Produktion nachweisen. Dabei ist interessant, daß die B-Zellaktivität dieser Patienten sowohl von den eigenen autologen Monozyten als auch durch Monozyten von NP supprimierbar war, umgekehrt aber die Ig-Produktion von NP durch Patientenmonozyten nicht beeinflußt werden konnte. Da aufgrund dieser Ergebnisse den Patientenmonozyten isoliert keine supprimierende Funktion zukommt, schlossen Burns u.a., da der supprimierende Monozyteneffekt nur in immunpathologischen Erkrankungen mit hyperaktivierten B-Zellen zu beobachten war, daß diese Form der monozytenvermittelten Suppression von der Aktivität der B-Zellen

abhängt (das entspräche der von Twomey hypothetisch angenommenen Phase B - s.o.).
Die Rolle der Monozyten bei der bei HD bekannten Immundefizienz ist umstritten. Von einigen Autoren (33, 70, 76, 88) wird sie wenigstens partiell pathologischen "Suppressor"-Monozyten zugeschrieben, während andere (34, 55) keinen Hinweis für abnormale Monozyten bei HD-Patienten fanden.
Gestützt auf die Ergebnisse von Rosenberg und Lipsky (65, 66, 67), die nachweisen konnten, daß die Differenzierung von B-Zellen zu ISC unter PWM-Stimulation monozytenabhängig ist sowie die Ergebnisse von mehreren Autoren (33, 76, 88), die nahelegen, daß Monozyten bei HD für die supprimierte T-Lymphozytenproliferation in vitro zumindest mitverantwortlich sind, ging es uns vor allem um die Frage, ob der von uns im RHPA nachgewiesene Defekt der Differenzierung von peripheren B-Zellen zu ISC monozytenvermittelt ist. Unsere Ergebnisse (vgl. 3.5.2.) zeigen eine von der Monozytenkonzentration abhängige Suppression der Differenzierung von normalen PBL zu ISC, d.h. je größer die Monozytenkonzentration ist, umso ausgeprägter ist die Suppression. Das für unsere Fragestellung wichtigste Resultat ist, daß sich im RHPA kein Anhalt für eine signifikant gesteigerte oder verminderte suppressive Aktivität der HD-Monozyten im Vergleich zu normalen autologen oder allogen Monozyten in den angesetzten Kokulturen fand. Nach den vorliegenden Ergebnissen besteht also kein Anhalt, einen intrinsischen Defekt von HD-Monozyten anzunehmen. In Übereinstimmung mit unseren Resultaten konnten de Mulder u.a. (55) nachweisen, daß die in vitro Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen bei HD-Patienten ungestört verläuft. Sie schlossen daraus auf eine normale Monozytenfunktion bei M. Hodgkin. Holm u.a. (34) konnten zeigen, daß Monozyten von Patienten mit aktivem HD normale Helfer und Suppressor Effekte auf ConA-stimulierte PBL (von NP und HD-Patienten) ausüben, weiter fanden sie keine Abnormalitäten der Antikörper-abhängigen Zytotoxizität bei HD-Monozyten. Für die Existenz von hypersuppressive Monozyten bei HD fanden sie keinen Hinweis. Diesen (34, 55) und unseren Resultaten scheinen mehrere Veröffentlichungen zu widerspre-

chen, die von einer deutlich erhöhten, monozytenvermittelten (oder zumindest teilweise monozytenvermittelten) Suppression der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation berichten. So fanden Twomey u.a. (88) in 10 von 17 unbehandelten HD-Patienten eine monozytenvermittelte Suppression sowohl der mitogeninduzierten T-Zellproliferation (als Testsystem diente die ^{3}H-Thymidininkorporation) als auch der mitogeninduzierten Ig-Produktion (vermittels Bestimmung der Ig-Konzentrationen in den jeweiligen Umständen), die in einigen Fällen mit Indomethacin aufgehoben werden konnte. Das Ausmaß der Suppression korrelierte mit der Monozytenkonzentration in den Zellpräparationen; bei HD-Patienten waren die Monozytenkonzentrationen meist signifikant höher als bei NP. Twomey u.a. nehmen an, da dieser Monozytose in den Kulturen keine periphere Monozytose entspricht, daß sie im Laufe der Zellpräparation akquiriert wurde. Damit stellt sich die Frage, ob die Suppression durch Monozyten nicht eher ein quantitatives Problem ist, weniger eine qualitative Abnormalität der HD-Monozyten, zumal Twomey u.a. bei entsprechender Erhöhung der Monozytenkonzentration in Kulturen mit PBL von NP eine vergleichbare Suppression fanden. Aufgrund unserer eigenen Untersuchungen vermuten wir, daß es sich eher um ein quantitatives Problem handelt.
Schechter und Soehnlein (70) nehmen aufgrund ihrer Untersuchungen an, daß inhibitorische Monozyten-Lymphozyten-Interaktionen ein Grund für die herabgesetzte zellvermittelte Immunität bei HD sind. Ähnlich wie Twomey u.a. konnten sie in Zellpräparationen von HD-Patienten hohe Monozytenkonzentrationen nachweisen. In 5 von 8 Patienten normalisierte sich die herabgesetzte Mitogenstimulierbarkeit der PBL nach Entfernung der Monozyten. Überraschenderweise führte eine Bestrahlung der Monozyten nicht zur Aufhebung der Suppression (vgl. oben: der Literatur folgend sind zwei monozytenvermittelte Suppressorsysteme etabliert, eines funktioniert über die Freisetzung von Prostaglandin, das andere erfordert intakte Monozyten - um diese Systeme kann es sich hier wohl nicht handeln). Nach Halbierung der Monozytenkonzentration fanden Schechter und Soehnlein weiterhin eine deutliche Suppression. Dieses Ergebnis macht wiede-

rum eine unspezifische Suppression bei HD infolge hoher Monozytenkonzentration weniger wahrscheinlich, zumindest was die Suppression der Mitogenstimulierbarkeit der Lymphozyten angeht.
Nach Sibbitt u.a. (76) besitzen HD-Patienten eine, an Glaswolle adhärente Suppressorzelle, die zumindest zum Teil für die Mitogenminderstimulierbarkeit verantwortlich ist. Nach Entfernung dieser Zelle konnte die Stimulierbarkeit der HD-PBL durch PHA deutlich erhöht werden, umgekehrt führte die Entfernung der an Glaswolle adhärenten Zellen bei NP zu einer verminderten PHA-Stimulierbarkeit. Da überwiegend Monozyten und C3-Rezeptor tragende Lymphozyten unter den Glaswoll-adhärenten Zellen zu finden waren, schlossen Sibbitt u.a. auf die Existenz einer Suppressorzelle bei HD, die entweder zu den Monozyten gehört, ein C3-Rezeptor tragender Lymphozyt ist oder einer anderen Subpopulation adhärenter Lymphozyten angehört.

Hillinger u.a. (33) bestätigen eine deutlich reduzierte ^{3}H-Thymidininkorporation bei HD-PBL (nach PBL-Stimulation in einer modifizierten MLC). Aufgrund ihrer Ergebnisse in selben Testsystem nach Isolierung von PBL-Subpopulationen sowie ben sie diese reduzierte Stimulierbarkeit in 4 Fällen Suppressor T-Zellen zu und in 6 Fällen supprimierenden Monozyten.
Der mögliche Einfluß hoher Monozytenkonzentrationen auf die reduzierte Stimulierbarkeit der HD-PBL wurde von ihnen nicht untersucht.
Wir haben uns auf den Einfluß von Monozyten auf die reduzierte Ig-Produktion im PWM-A konzentriert. Eine prinzipielle Unvereinbarkeit unserer Ergebnisse mit denen der aufgeführten und diskutierten Arbeiten sehen wir v.a. deshalb nicht, weil sowohl die Testsysteme als auch die Fragestellungen nicht dieselben sind und die Resultate der oben aufgeführten und diskutierten Autoren eher für komplexe und variable Mechanismen für die bei HD beobachtete Immunsuppression sprechen. Leider konnten wir infolge geringer Zellmengen den Einfluß von normalen und HD-Monozyten auf HD-PBL nicht testen.

so daß offen bleibt, ob HD-Monozyten nur im Zusammenwirken mit aktivierten B-Zellen die B-Zelldifferenzierung supprimieren, wie das Burns u.a. (s.o.) für andere immunpathologische Erkrankungen vermuten. Das zu testen wäre insbesondere auch deshalb interessant gewesen, weil sich in den Spontanplaques (s. 3.3.1.) mit HD-PBL im Vergleich zu normalen PBL höhere Plaquezahlen fanden.

4.4. Suppression in Kokulturen mit peripheren Blutlymphozyten und Lymphozytensubpopulationen von HD-Patienten und Normalpersonen

Unsere bisherigen Ergebnisse sprechen dagegen, daß "Suppressor"-Monozyten für die in vitro gefundene Suppression der B-Zelldifferenzierung verantwortlich sind. Durch ConA-Stimulation von HD-PBL konnten wir wohl T-Suppressorzellen induzieren, diese waren jedoch im Vergleich zur Aktivität von normalen, ConA-induzierten T-Suppressorzellen nicht hyperaktiv.
In den Immunmarkeruntersuchungen konnten wir eine T-Helfer/T-Suppressorzellimbalance im Sinne einer absoluten Verminderung der T-Helferpopulation nachweisen. In Kokulturen zwischen ungetrennten PBL von HLA differenten NP sowie zwischen ungetrennten HD-PBL und normalen PBL (s. Tab. 4), fiel neben einer fast regelhaften, mäßig ausgeprägten, aber signifikanten Erniedrigung der Anzahl der ISC, eine ganz massive Suppression der B-Zelldifferenzierung in zwei Kokulturen auf.
Wie oben bereits erwähnt, könnte die in vitro nachgewiesene Suppression der B-Zelldifferenzierung im Rahmen dieser Ergebnisse als Folge eines T-Helferzelldefekts, einer T-Helferzellverminderung sowie einer (möglicherweise durch ConA nicht stimulierbaren) Suppressorzellpopulation interpretiert werden.

Zur weiteren Klärung dieser Frage setzten wir Kokulturen zwischen Lymphozytensubpopulationen auf (s. 3.5.3.). Hier zeigten sich in den Exp. I und II eine signifikante Minderstimulierbarkeit normaler B-Zellen durch HD-T-Zellen und umgekehrt eine signifikante Zunahme der PWM-Stimulierbarkeit von HD-B-Zellen durch normale T-Zellen. In Exp. III waren diese Effekte um ein

mehrfaches deutlicher.
Die nachgewiesene T-Helferzellverminderung halten wir nicht für eine ausreichende Erklärung für die reduzierte B-Zelldifferenzierung. Es ist hinreichend bekannt (16, 43, 80), daß nur eine geringe Anzahl funktionsfähiger T-Zellen nötig ist, um die B-Zelldifferenzierung zu gewährleisten, weiter zeigen unsere Ergebnisse mit Lymphozytensubpopulationen (s. Tab. 8) in den Kokulturen mit (in Relation zu den B-Zellen) unphysiologisch niedrigen T-Zellzahlen (50:50) fast konstant höhere Plaquezahlen.
Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich nach unseren Ergebnissen (zumindest was die in vitro Suppression der B-Zelldifferenzierung angeht) ursächlich um eine Störung der T-Zellfunktion. Nicht entscheiden können wir aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die Frage, ob die Suppression der B-Zelldifferenzierung durch HD-T-Zellen auf einem T-Helferzelldefekt oder einem Defekt der T-zellvermittelten Suppression (im Sinne einer überschießenden Suppression) zurückzuführen ist.
Damit stehen unsere Ergebnisse zumindest zum Teil in Einklang mit denen von Hillinger u.a. (49), die in 4 von 10 untersuchten HD-Patienten eine T-Zellvermittelte Suppression (der PBL-Proliferation) zeigen konnten. Daß die in vitro Suppression der B-Zelldifferenzierung durch einen intrinsischen T-Zelldefekt verursacht ist, wird auch durch die jüngst publizierten Ergebnisse von Fisher u.a. (18) gestärkt. Fisher u.a. kokultivierten gereinigte T-Zellen (sowohl Ia-tragende Zellen, als auch adhärente Zellen wurden entfernt) von NP und HD-Patienten als Effektorzellen mit L 428 Tumorzellen als Modulatorzellen (accessory cells) im Verhältnis 99:1 (die L 428-Zellinie ist eine Langzeit-Gewebekulturlinie von Reed-Sternbergzellen, die aus dem Pleuraerguß eines HD-Patienten gewonnen worden waren). Normale T-Zellen konnten in diesen Kokulturen Mitogen induziert massiv stimuliert werden, während HD-Patienten in fortgeschrittenem Stadium (III B o. IV) eine deutlich reduzierte Stimulierbarkeit zeigten, was nach Fisher u.a. auf einen intrinsischen T-Zelldefekt schließen läßt.

Nach den Ergebnissen von Sibbit u.a. (76) sind, wie schon oben bemerkt, möglicherweise C3-Rezeptor tragende Lymphozyten oder eine adhärente Lymphozytensubpopulation für die Suppression verantwortlich.
In der zitierten Literatur wird neben der monozytenvermittelten Suppression, die wir aufgrund unserer Ergebnisse nicht bestätigen können, u.a. eine T-Suppressorzellvermittelte Suppression ätiologisch für die bei HD gefundenen pathologischen Immunphänomene verantwortlich gemacht. Ein T-Helferzelldefekt wird zwar als mögliche Ätiologie aufgeführt (bei einer, was Ätiologie und Pathophysiologie, nicht nur die Immunphänomene betreffend, so unklaren Erkrankung wie HD angeht, meist zur Komplettierung der "Differential"-Ätiologie), beweiskräftige experimentelle Ergebnisse liegen unseres Wissens hierzu jedoch nicht vor. Aufgrund unserer Ergebnisse, glauben wir Hinweise für das Vorliegen eines T-Helferzelldefekts gefunden zu haben, sind jedoch angesichts der Komplexität der Immunvorgänge vorsichtig genug, neben einer Störung der Interaktion im Immungeschehen (an der möglicherweise mehrere Lymphozytensubpopulationen beteiligt sind und möglicherweise auch Monozyten), eine T-Suppressorzellvermittelte Ätiologie des Immundefekts bei HD nicht auszuschließen. Weitere Untersuchungen mit verfeinerten Methoden werden nötig sein, um eine genauere Zuordnung der bei HD beobachteten Suppressionsphänomene möglich zu machen.

5. Zusammenfassung

Patienten mit M. Hodgkin zeichnen sich klinisch durch einen Defekt der zellvermittelten Immunantwort aus. In der vorliegenden Arbeit haben wir bei Patienten mit aktivem, unbehandeltem M. Hodgkin mit Hilfe eines Reverse Hemolytic Plaque Assays (RHPA) untersucht, ob zusätzlich eine Störung der humoralen Immunantwort vorliegt.

Der RHPA bietet die Möglichkeit, nach Stimulation mit einem Mitogen die Anzahl Immunglobulin sezernierender Zellen (ISC) in einer Lymphozytenpopulation zu bestimmen und so die B-Zelldifferenzierung unter dem Einfluß sowohl von T-Helfer- und T-Suppressorzellen als auch von Monozyten zu untersuchen.
Nachdem wir bei Patienten mit M. Hodgkin im Vergleich zu Normalpersonen nach Stimulation mit PWM eine deutlich verminderte Fähigkeit der B-Lymphozyten in ISC zu transformieren nachgewiesen haben, setzten wir Kokulturen zwischen mononukleären Zellen (MNC) von Normalpersonen und Patienten mit M. Hodgkin an. Auch hier zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen eine fast regelhafte, über die Erwartungswerte hinausgehende Verminderung der ISC, was bedeutet, daß MNC von Patienten mit M. Hodgkin in der Lage sind, normale B-Lymphozyten in ihrer Transformation zu ISC zu hemmen.
Um den Mechanismus dieser Suppression der B-Zelldifferenzierung durch die MNC von Patienten mit M. Hodgkin weiter zu charakterisieren, setzten wir Kokulturen zwischen ConA präinkubierten Modulatorzellen (von Patienten oder Normapersonen) und normalen Effektorzellen an. Die Fragestellung in dieser Versuchsreihe war, ob eine gesteigerte T-Suppressorzellaktivität als Ursache für dieses Phänomen verantwortlich gemacht werden kann. Wir konnten eine durch die Modulatorzellen induzierte, deutliche Suppression der B-Zelldifferenzierung beobachten, aber die Modulatorzellen von Patienten mit M. Hodgkin zeigten im Vergleich zu normalen Modulatorzellen keine gesteigerte supprimierende Aktivität.
In einer weiteren Versuchsreihe untersuchten wir den Einfluß von Monozyten auf die B-Zelldifferenzierung. In Kokulturen mit gereinigten Monozyten wiesen wir eine von der Monozytenkonzentration abhängige Suppression der B-Zelldifferenzierung nach, fanden aller-

dings keinen Unterschied der supprimierenden Aktivität zwischen normalen Monozyten und Monozyten von Patienten mit aktivem M. Hodgkin. In einer letzten Versuchsreihe mit Kokulturen zwischen Lymphozytensubpopulationen zeigte sich eine ausgeprägte, PWM-induzierte Minderstimulierbarkeit normaler B-Zellen, wenn diese mit Patienten T-Zellen kokultiviert wurden und umgekehrt eine deutliche Zunahme der PWM-Stimulierbarkeit der Patienten-B-Zellen durch normale T-Zellen.
Parallel zu den funktionellen Untersuchungen führten wir Immunmarkeruntersuchungen mit monoklonalen Antikörpern durch. Hierbei konnten wir zeigen, daß bei Patienten mit M. Hodgkin ein absoluter Mangel an OKT 4-positiven Zellen (T-Helfer-Zellen) besteht.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß bei Patienten mit M. Hodgkin eine Störung der Differenzierung von B-Lymphozyten besteht, wenn diese in vitro mit dem polyklonalen B-Zellaktivator PWM stimuliert wurden. Als Ursache dieser Störung ist aufgrund unserer Kokulturexperimente höchstwahrscheinlich eine gesteigerte supprimierende Aktivität der T-Zellen anzunehmen. Zum anderen liegt bei Patienten mit M. Hodgkin möglicherweise eine Störung der T-Helferzellfunktion vor, wie unsere Experimente mit Lymphozytensubpopulationen zeigten. Damit im Einklang steht auch die absolute Verminderung der OKT 4-positiven Zellen (T-Helferzellen) im peripheren Blut dieser Patienten. Eine gesteigerte Suppression durch Monozyten von Patienten im Vergleich zu Kontrollen konnten wir in unseren Versuchen nicht nachweisen.

6. Literaturverzeichnis

1 Abo T., Balch Ch.M.:
A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1)
J. Immunol. 127, 1024 (1981)

2 Björkholm M., Holm G., Mellstedt H. and Pettersson D.:
Immunological capacity of lymphocytes from untreated patients with Hodgkin's disease evaluated in mixed lymphocyte culture
Clin. Exp. Immunol. 22, 373 (1976)

3 Bobak D., Whisler R.:
Human B lymphocyte colony responses
J. Immunol. 125, 2764 (1980)

4 Burns F., Librach C.L., Frazer H., Kronborg I.J., Mackay I.R.:
Spontanlous Reverse Hemolytic Plaque Formation III. Monocyte-Mediated Suppression of Elevated Plaque Formation in Autoimmune Disease
Clin. Immunol. and Immunopathol. 24, 386 (1982)

5 Carbone P.P., Kaplan H.S., Musshoff K., Smithers D.W., Tubiana M.:
Reports of the committee on Hodgkin's disease staging classification
Cancer Res. 31, 1860 (1971)

6 Casazza A.R., Duval C.P. and Carbone P.P.:
Infection in lymphoma
J. Am. Med. Assoc. 197, 118 (1966)

7 Chase M.W.:
Delayed type hypersensitivity and the immunology of Hodgkin's Disease with a parallel examination of sarcoidosis
Cancer Res. 26, 1097 (1966)

8 Corder M.P., Young R.C., Brown R.S. and De Vita V.T.:
Phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation: the relationship to prognosis of Hodgkin's disease
Blood 39, 595 (1972)

9 Dosch H.M., Schuurman R.K.B., Gelefand E.W.:
Polyclonal activation of human lymphocytes in vitro
II. Reappraisal of T and B cell-specific mitogens
J. Immunol. 125, 827 (1980)

10 Dwyer J.M., Johnson C., Desaules M.:
Behaviour of Human Immunoregulatory Cells in Culture.
I. Variable Requiring Consideration for Clinical Studies
Clin. Exp. Immunol. 38, 499 (1979)

11 Eby W.C., Chong C.A., Dray S., Molinaro G.A.:
Enumerating immunoglobulin-secreting cells among periphal human lymphocytes. A hemolytic plaque assay for a B-cell function
J. Immunol. 115, 1700 (1975)

12 Ekstedt R.D., Waterfield J.D., Nespoli L., Moller G.:
Mechanism of action of suppressor cell in vivo; Concanavalin A activated suppressor cells do not directly affect B cells
Scand. J. Immunol. 6, 247 (1977)

13 Eltringham J.R., Kaplan H.S.:
Impaired delayed-hypersensitivity responses in 154 patients with untreated Hodgkin's disease
Natl. Cancer Inst. Monogr. 36, 107 (1973)

14 Fauci A.S., Pratt K.R.:
Activation of human B-lymphocytes.
I. Direct plaque-forming cell assay for the measurement of polyclonal activation and antigenic stimulation of human B-lymphocytes
J. Exp. Med. 144, 674 (1976)

15 Fauci A.S., Pratt K.R.:
Polyclonal activation of bone-marrow derived lymphocytes from human peripheral blood measured by a direct plaque-forming cell assay
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 3676 (1976)

16 Fauci A.S., Pratt K.R., Whalen G.:
Activation of human B-lymphocytes.
II. Celluler interaction in the PFC response of human tonsillar and peripheral blood B-lymphocytes to polyclonal activation by pokeweed mitogen
J. Immunol. 117, 2100 (1976)

17 Finelt M., Hoffmann M.K.:
A human monocyte function test: Release of B-cell differentiation factor (BDF)
Clin. Immunol. and Immunopathol. 12, 281 (1979)

18 Fisher R.I., Bates S.E., Bostick-Bruton F., Tuteja N., Diehl V.:
Neoplastic Cells Obtained From Hodgkin's Disease Function As Accessory Cells For Mitogen-Induced Human T Cell Proliferative Responses
J. Immunol. 132, 2672 (1984)

19 Fleisher T.A., Greene W.C., Uchiyama T., Goldmann C.K., Nelson D.L., Blaese R.M., Waldmann T.A.:
Characterization of a soluable suppressor of human B cell immunoglobulin biosynthesis produced by a continous human suppressor T cell line
J. Exp. Med. 154, 156 (1981)

20 DeGast G.C., Halie M.R. and Nieweg H.O.:
Immunological responsiveness against two primary antigens in untreated patients with Hodgkin's disease
Eur. J. Cancer 11, 217 (1975)

21 Geha R.S., Merler E.:
Response of human thymus-derived (T) and non-thymus-derived (B) lymphocytes to mitogenic stimulation in vitro
Eur. J. Immunol. 4, 193 (1974)

22 Ginsburg W.W., Finkelmann F.D., Lipsky P.E.:
Circulating and mitogen-induced immunoglobulin secreting cells in human peripheral blood: evaluation by a modified reverse hemolytic plaque assay
J. Immunol. 120, 33 (1978)

23 Gmelig-Meyling F., UytdeHaag A.G.C.M., Ballieux R.E.:
Human B-cell activation in vitro
T cell-dependent pokeweed mitogen-induced differentiation of blood b lymphocytes
Cellular Immunology 33, 156 (1977)

24 Gmelig-Meyling F., Waldmann T.A.:
Human B Cell Activation in Vitro: Augmentation and Suppression by Monocytes of the Immunoglobulin Production Induced by Various B Cell Stimulants
J. Immunol. 126, 529 (1981)

25 Goeken N.E., Thompson J.S., Klassen L., Brown S.:
Human suppressor cells: evidence of funktionally distinct subsets
Hum. Immunol. 2, 65 (1981)

26 Goodwin J.S., Messner R.P., Bankhurst A.D., Peake G.T., Saiki G., Williams R.C.:
Prostaglandin producing suppressor cells in Hodgkin's disease
N. Engl. J. Med. 297, 963 (1977)

27 Graze P.R., Perlin E. and Royston I.:
In vitro lymphocyte dysfunction in Hodgkin's disease
J. Natl. Cancer Inst. 56, 239 (1976)

28 Greene W.C., Fleisher T.A., Waldmann T.A.:
Soluble suppressor supernatants elaborated by concanavalin A activated human mononuclear cells
J. Immunol. 126, 1185 (1981)

29 Gronowicz E., Coutinho A., Melchers F.:
A plaque assay for all cells secreting Ig of a given type or class
Eur. J. Immunol. 6, 588 (1976)

30 Haynes B.F., Fauci A.S.:
Activation of Human B Lymphocytes
III. Concanavalin A-induced Generation of Suppressor Cells of the Plaque-Forming Cell response of normal Human B Lymphocytes
J. Immunol. 118, 2281 (1977)

31 Herrmann F., Sieber G., Jauer B., Lochner A., Rühl H.:
Evaluation of the Circulating and Splenic Lymphocyte Subpopulations in Patients with Non-Hodgkin Lymphomas and Hodgkin's Disease Using Monoclonal Antibodies
Blut 47, 41 (1983)

32 Hersh E.M. and Oppenheim J.J.:
Impaired in vitro lymphocyte transformation in Hodgkin's disease
New Engl. J. Med. 273, 1006 (1965)

33 Hillinger S.M., Herzig G.P.:
Impaired cell-mediated immunity in Hodgkin's disease mediated by suppressor lymphocyts and monocyts
J. Clin. Invest. 60, 1620 (1978)

34 Holm G., Björkholm M., Johansson B., Mellstedt H., Lindemalm C.:
Monocyte function in Hodgkin's disease
Clin. Exp. Immunol. 47, 162 (1982)

35 Innes J.B., Kuntz M.M., Young T.K., Weksler M.E.:
Induction of suppressor activity in the antologous mixed lymphocyte reaction and in cultures with concanavalin A
J. Clin. Invest. 64, 1608 (1979)

36 Insel R.A., Merler E.:
The necessity for T cell help for human tonsil B cell responses to pokeweed mitogen: Induction of DNA synthesis, immunoglobulin and specific antibody production with a T cell helper factor produced with pokeweed mitogen
J. Immunol. 118, 2009 (1977)

37 Jerne N.K., Nordin A.A.:
Plaque formation in agar by single antibody producing cells
Science 140, 405 (1963)

38 Johnson H.M., Snuth B.G., Baron S.:
Inhibition of the primary in vitro antibody response by interferon preparations
J. Immunol. 114, 403 (1975)

39 Kadin M.E., Newcombe S.R., Gold S.B., Stites D.P.:
Origin of Hodgkin's cell
Lancet II, 167 (1974)

40 Kadin M.E., Stites D.P., Levy R., Warnke R.:
Exogenous immunoglobulin and the macrophage origin of Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease
New Engl. J. Med. 299, 1208 (1978)

41 Kadish A.S., Tansey F.A., Yu G.S., Doyle A.T., Bloom B.R.:
Interferon as a mediator of human lymphocyte suppression
J. Exp. Med. 151, 637 (1980)

42 Kallenberg C.G.M., De Gast G.C., The T.H.:
Suppression of DNA synthesis by ConA-activated human lymphocytes: role of monocytes in ConA-induced suppression
Clin. Exp. Immunol. 41, 583 (1980=

43 Keightley, R.G., Lawton A.R. and Cooper M.D.:
The T cell dependence of B cell differentiation induced by pokeweed mitogen
J. Immunol. 117, 1538 (1976)

44 Kelly W.D., Lamb D.L., Varco R.L. & Good R.A.:
Investigation of Hodgkin's disease with respect to problems of homotransplantation
Ann. New York Acad. Sci. 87, 187 (1960)

45 Knapp W., Baumgartner G.:
Monocyte-mediated suppression of human B lymphocyte differentiation in vitro
J. Immunol. 121, 1177 (1978)

46 Kung P.C., Talle M.A., Lifter J., Goldstein G., Change T.W.:
Production of monoclonal antibodies for clinical use:
Human T cells as target system. In: Knapp W. (ed.) Leukemia markers
Academic Press, New York, pp 161-171 (1981)

47 Kuritani T., Hirano T., Kishimoto T., Yamamura Y.:
In Vitro Immune Response of Human Peripheral Lymphocytes
II. Properties and Functions of ConcanavalinA-Induced Suppressor T Cells
Microbiol. Immunol. 23, 185 (1979)

48 Laughter A.H., Twomey J.J.:
Suppression of lymphoproliferation by high concentrations of normal human mononuclear leukocytes
J. Immunol. 119, 173 (1977)

49 Laughter A.H., Rice L., Twomey J.J.:
Suppression of Lymphocyte Responses by Monocytoid cells Does not require Cell-Cell Contact
Cell. Immunol. 60, 440 (1981)

50 Lobo P.I., Spencer C.E.:
Inhibition of humoral and cell-mediated immune responses in man by distinct suppressor cell systems
J. Clin. Invest. 63, 1157 (1979)

51 Lukes R.J., Butler J.J.:
The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease
Cancer Res. 26, 1063 (1966)

52 Miller T., Marshall E.:
Suppressor Cell Regulation of Cell-mediated Immune Responses in Renal Infection. In Vitro Modulation of Suppressor Cell Activity
J. Clin. Invest. 66, 621 (1980)

53 Moretta L., Webb S.R., Grossi C.E., Lydyard P.M., Cooper M.D.:
Functional analysis of two human T-cell subpopulations:
Help and suppression of B-cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG
J. Exp. Med. 146, 184 (1977)

54 Moretta L., Mingari M.C., Moretta A., Cooper M.D.:
Human T lymphocyte suppopulations: Studies of the mechanism by which T cells bearing Fc receptors for IgG suppress T-dependent B cell differentiation induced by pokeweed mitogen
J. Immunol. 122, 984 (1979)

55 De Mulder P.H.M., Van Rennes H., Mier P.D., Bergers M., De Pauw B.E., Haanen C.:
Characterization of monocyte maturation in adherent and suspension cultures and its application to study monocyte differentiation in Hodgkin's disease
Clin. Exp. Immunol. 54, 681 (1983)

56 Piguet P.-F., Irle C., Vassalli P.:
Immunosuppressor cells from newborn mouse spleen are macrophages differentiating in vitro from monoblastic precursors
Eur. J. Immunol. 11, 56 (1981)

57 Powell A.E., Leon M.A.:
Reversible Interaction of Human Lymphocytes with Mitogen Concanavalin A
Exp. Cell. Res. 62, 315 (1970)

58 Reinherz E.L., Kung P.C., Goldstein G., Schlossman S.F.:
Further characterization of the human inducer T cell subset defined by monoclonal antibody
J. Immunol. 123, 2894 (1979)

59 Reinherz E.L., Kung P.C., Goldstein G., Schlossmann S.F.:
Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4061 (1979)

60 Rice L., Laughter A.H., Twomey J.J.:
Three suppressor systems in human blood that modulate lymphoproliferation
J. Immunol. 122, 991 (1979)

61 Rich R.R. and Pierce C.W.:
Biological expressions of lymphocyte activation.
I. Effects of phytomitogens on antibody synthesis in vitro
J. Exp. Med. 137, 205 (1973)

62 Rich R.R. and Pierce C.W.:
Biological expressions of lymphocyte activation.
II. Generation of a population of thymus-derived suppressor lymphocytes
J. Exp. Med. 137, 649 (1973)

63 Rinehart J.J., Orser M., Kaplan M.E.:
Human monocyte and macrophage modulation of lymphocyte proliferation
Cellular Immunology 44, 131 (1979)

64 Romagnani S., Amadori A., Maggi E., Biagiotti R., Ricci M.:
Studie of some immunological parameters in untreated patients with Hodgkin's disease
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 55, 429 (1977)

65 Rosenberg S.A., Lipsky P.E.:
Monocyte dependence of pokeweed mitogen-induced differentiation of immunoglobulin-secreting cells from human peripheral blood mononuclear cells
J. Immunol. 122, 926 (1979)

66 Rosenberg S.A., Lipsky P.E.:
The role of monocyte factors in the differentiation of immunoglobulin secreting cells from human peripheral blood B cells
J. Immunol. 125, 232 (1980)

67 Rosenberg S.A., Lipsky P.E.:
The role of monocytes in pokeweed mitogen-stimulated human B cell activation: Seperate requirements for intact monocytes and a soluble monocyte factor
J. Immonol. 126, 1341 (1981)

68 Rühl H., Rühl U., Sieber G.:
Immune alterations in patients with Hodgkin's disease
Cell. Mol. Biol. 25, 409 (1980)

69 Rühl H., Enders B., Bur M., Sieber G.:
Impaired B-lymphocyte reactivity in patients with Hodgkin's disease and Non-Hodgkin's lymphomas
Blut 42, 271 (1981)

70 Schechter G.P., Soehnlen F.:
Monocyte-mediated Inhibition of Lymphocyte Blastogenesis in Hodgkin's Disease
Blood 52, 261 (1978)

71 Schulof R.S., Garofalo J.A., Good R.A., Gupta S.:
Concanavalin A-induced suppressor cell activity for T-cell proliferative responses: antologous and allogenie suppression in aging humans
Cell Immunol. 56, 80 (1980)

72 Schulof R.S., Lee B.J., Lacher M.J., Straus D.J., Clarkson B.D., Good R.A., Gupta S.:
Concanavalin A-Induced Suppressor Cell Activity in Hodgkin's Disease
Clin. Immunol. and Immunopathol. 16, 454 (1980)

73 Schwartz S.A., Choi Y.S., Shou L. and Good R.A.:
Modulatory effects on immunoglobulin synthesis and secreting by lymphocytes from immunodeficient patients
J. Clin. Invest. 59, 1176 (1977)

74 Schwartz S.A., Shou L., Good R.A., Choi Y.S.:
Suppression of immunoglobulin synthesis and secretion by peripheral blood lymphocytes from normal donors
Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 2099, 1977

75 Shou L., Schwartz S.A., Good R.A.:
Suppressor cell activity after Concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors
J. Exp. Med. 143, 1100 (1976)

76 Sibbelt W.L., Bankhurst A.D., William R.C.:
Studies of cell populations mediating mitogen hyporesponsivness in patients with Hodgkin's disease
J. Clin. Invest. 61, 55 (1978)

77 Sieber G., Bochert G., Enders B., Rühl H.:
Characteristics of immunoglobulin secretion in man evaluated by a reverse hemolytic plaque assay
Blut 41, 81 (1980)

78 Sieber G., Herrmann F., Komischke B., Wegscheider K., Teichmann H., Rühl H.:
Modulation of Pokeweed-Mitogen-Induced Immunoglobulin Production by Preincubated Autologous and Allegenic Lymphocyts in Man
Immunol. Clin. sper. II, 2, 115 (1983)

79 Sieber G., Herrmann F., Rühl H.:
Suppression of B-lymphocyte Differentiation in Vitro by Mononuclear Peripheral Blood and Spleen Cells from a Patient with Active Hodgkin's Disease
Immunol. Clin. sper. III, 2 (1984)

80 Siegal F.P. and Siegal M.:
Enhancement by irrediated T cells of human plasma cell production. Dissection of helper and suppressor functions in vitro
J. Immunol. 118, 642 (1977)

81 Stein H., Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Diehl V., Mason D.Y., Bartels H., Ziegler A.:
Evidence for the detection of the normal counterpart of Hodgkin and Sternberg-Reed cells
Hematol. Oncology 1, 21 (1983)

82 Stites D.P., Stobo J.D., Fudenberg H.H., Wells J.V.:
Basic and Clinical Immunology 5th edition
Lange Medical Publications pp. 384-385 u. 415-417 (1984)

83 Stobo J.D.:
Immunosuppression in man: Suppression by macrophages can be mediated by interactions with regulatory T cells
J. Immunol. 119, 918 (1977)

84 Strelkauskas A.J., Wilson B.S., Callery R.T., Chess L., Schlossman S.F.:
T-Cell Regulation Of Human Peripheral Blood B-Cell Responsiveness
J. Exp. Med. 146, 1765 (1977)

85 Thomas V., Sosman J., Irigyen D., Friedman S.M., Kung P.C., Goldstein G., Chess L.:
Functional analysis of human T cell subset defined by monoclonal antibodies
I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B cell differentiation
J. Immunol. 125, 2402 (1980)

86 Tsokos G.C., Christian C.B., Balow J.E.:
Concanavalin-induced suppressor cells: Characterization on the basis of corticosteroid and radiation sensitivity
Immunology 47, 85 (1982)

87 Twomey J.J., Laughter A.H., Farrow S., Douglas C.C.:
Hodgkin's disease, an immunodepleting and immunosuppressive disorder
J. Clin. Invest. 56, 467 (1975)

88 Twomey J.J., Laughter A.H., Rice L., Ford R.:
Spectrum of Immunodeficiencies with Hodgkin's Disease
J. Clin. Invest. 66, 629 (1980)

89 Twomey J.J. (Ed.):
The Pathophysiology of Human Immunologic Disorders
Urban u. Schwarzenberg p. 39 (1983)

90 Unanue E.R.:
The regulation of lymphocyte functions by the macrophage
Immunol. Rev. 40, 227 (1978)

Lebenslauf

Name:	Reim
Vorname:	Wolfgang Johannes
Geburtsdatum/ort:	30.12.1950 in Kempten/Allgäu
Eltern:	Margarete und Hans Reim
Schulausbildung:	1957-1962 Grundschule in Marktoberdorf und Kempten
	1962-1971 mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium in Marktoberdorf und Gießen
	Juni 1971 Abitur in Gießen
Studium:	WS 71/2 FU Berlin, Philosophie
	WS 73/4 FU Berlin, Mathematik
	Oktober 76 Vordiplom im Fach Mathematik
	WS 77/8 Medizinstudium an der FU Berlin
	November 83 Approbation als Arzt
Arbeitsverhältnisse:	April 80-April 83 Studentischer Tutor
	Oktober 81-April 83 Wiss. Hilfskraft im Hämatologischen Forschungslabor des Klinikum Steglitz
	seit März 84 Assistenzarzt in der Neurologie (Direktor: Prof. Dr. F. Jerusalem) der Universitätsklinik Bonn.

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen